



1638.

1638.

Patitioner's Docket No. U 011098-6

**PATENT**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of: OSCAR JOHANNES MARIA GODDIJN, et al.

Serial No.: 08/779,460

Group No.: 1638

Filed: January 7, 1997

Examiner: David T. Fox

For: Enhanced Accumulation of Trehalose in Plants

**Commissioner for Patents**

**P. O. Box 1450**

**Alexandria, VA 22313-1450**

**TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY**

Attached please find the certified copy with English Translation of the foreign application from which priority is claimed for this case:

Country: Paraguay

Application  
Number: 9/96

Filing Date: January 12, 1996

**WARNING:** "When a document that is required by statute to be certified must be filed, a copy, including a photocopy or facsimile transmission of the certification is not acceptable." 37 C.F.R. 1.4(f) (emphasis added).

**CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. 1.8a)**

I hereby certify that this correspondence is, on the date shown below, being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the Commissioner for Patents, P. O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

Date: October 14, 2003

Signature

**CLIFFORD J. MASS**

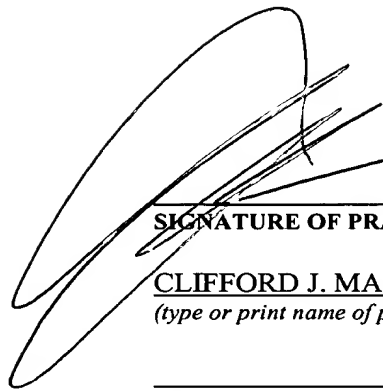
(type or print name of person certifying)

(Transmittal of Certified Copy—page 1 of 2) 5-4

Reg. No. 30,086

Tel. No.: (212) 708-1890

Customer No.: 00140



SIGNATURE OF PRACTITIONER  
CLIFFORD J. MASS  
(type or print name of practitioner)

P.O. Address

c/o Ladas & Parry  
26 West 61<sup>st</sup> Street  
New York, N.Y. 10023

*NOTE: "The claim to priority need be in no special form and may be made by the attorney or agent, if the foreign application is referred to in the oath or declaration, as required by § 1.63." 37 C.F.R. 1.55(a).*



**MINISTERIO DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
Dirección de la Propiedad Industrial

<b>PATENTE</b>		Reservado para la Administración	(21) Expediente Nº 9/96				
			(22) Fecha y hora de presentación 13/11/96				
Patente de Invención <input checked="" type="checkbox"/>			Recibo de pago de Tasa				
Revalida de Patente <input type="checkbox"/>			(30) Registro o solicitud que se revalida Nº				
			(11) Registro Nº				
(51) Clasif. Int.			(45) De fecha				
(54) DENOMINACION							
"ACUMULACION INTENSIFICADA DE TREHALOSA EN LAS PLANTAS"							
(71) SOLICITANTE							
Nombre MOGEN International nv							
Domicilio Einsteinweg 97, 2333 CB LEIDEN, The Netherlands País NL							
(72) INVENTOR							
N mbr 1- GODDIJN, Oscar Johannes M.							
2- VERWOERD, Teunis Cornelis							
Domicilio 3- KRUTWAGEN, Ronny Wilhelmus Hermanus H. País NL							
4- VOOGD, Eline							
(74) AGENTE							
Nombre HUGO T. BERKEMEYER Poder nº adjunto							
Domicilio Benjamin Constant 835, 4o. Piso, Asunción Matrícula nº 6							
Declaración jurada de solicitudes anteriores sobre la misma área técnica o la misma invención en el país o en el extranjero.							
<table border="1"><thead><tr><th>Número</th><th>de fecha</th><th>país</th><th>Clasif. Internac.</th></tr></thead></table>				Número	de fecha	país	Clasif. Internac.
Número	de fecha	país	Clasif. Internac.				
CERTIFICO: Que la presente solicitud de patente de invención denominado "ACUMULACION INTENSIFICADA DE TREHALOSA EN LAS PLANTAS" ha sido presentado en la DIRECCION DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL DE LA REPUBLICA DEL PARAGUAY con los datos mencionados en ella, en fecha 12 de enero de 1996 con el Acta No. 9/96.							
Firma del solicitante o apoderado		Firma del patrocinante					
		Firma y sello del funcionario					

005

E S T A M P I L L A S

## ACUMULACION INTENSIFICADA DE TREHALOSA EN LAS PLANTAS

## ÁMBITO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método para la producción de trehalosa en células vegetales, y plantas. La invención se refiere particularmente a un método para el aumento de los niveles de acumulación de trehalosa en las plantas capaces de producir trehalosa. La invención incluye además plantas más complejas, preferentemente *Angiospermas*, y las partes de éstas, las cuales como resultado de tales métodos, contienen niveles de trehalosa relativamente altos. La invención se refiere además a las células vegetales, las plantas o partes de éstas según la invención obtenidas después de procesar éstas.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

Trehalosa es un nombre general dado al D-glucocel D-glucósido que incluye disacáridos basados en dos moléculas de glucosa enlazadas  $\alpha$ -,  $\alpha$ ,  $\beta$ - y  $\beta$ ,  $\beta$ -. Trehalosa, y especialmente  $\alpha$ -trehalosa. 1-(O- $\alpha$ -glucopiranosil) -1'-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil) es un disacárido muy extendido que aparece de forma natural. Sin embargo, la trehalosa no se encuentra generalmente en las plantas, aparte de algunas excepciones, tales como la especie de plantas *Selaginella lepidophylla* (*Pteridophyta*) y *Myrothamnus flabellifolia*. Aparte de estas especies, la trehalosa se encuentra en módulos de la raíz de la *Leguminosae* (*Spermatophytae*, *Angiospermae*), en donde es sintetizada por bacteroides; y la trehalosa así producida aquí es capaz de difundirse en las células de la raíz. Aparte de estos hechos accidentales, las especies de plantas que pertenecen a la *Spermatophyta* aparentemente carecen de la facultad de producir y/o acumular trehalosa.

En la solicitud de la patente Internacional WO-95/01446, registrada el 30 de Junio de 1994 bajo el nombre de MOGEN International NV, se describe un método para proporcionar a las plantas, que no son naturalmente capaces de producir trehalosa, la capacidad de hacerlo. El método consta de la introducción en las células o en dichas plantas un polinucleótido recombinante codificando la sintasa de fosfato de trehalosa bajo el control de los elementos reguladores necesarios para la expresión de la mencionada ADN recombinante en las células vegetales. En una realización las plantas del tabaco y de la patata han sido transformadas con un polinucleótido recombinante codificando TPS de la *E. Coli*, bajo el control del activador CaMV 35S ARN. Los niveles de acumulación de trehalosa en estas plantas tienden a ser bastante bajos.

A pesar de la ausencia de trehalosa como sustrato en la mayoría de las especies de plantas mas complejas, la presencia de actividad de producción de la trehalosa ha sido registrada en un número considerable de especies de plantas mas complejas, incluyendo aquellas que se sabe que



carecen de trehalosa. La actividad responsable se puede atribuir a la enzima trehalasa.

Los informes sugieren que la trehalosa, cuando se proporciona a los brotes desarrollados *in vitro* es tóxica o inhibidora del crecimiento de las células vegetales (Veluthambi K. et al., 1981, Plant Physiol. 68, 1369-1374). Las células vegetales que producen niveles bajos de trehalasa resultaron ser generalmente mas sensibles a los efectos desfavorables de la trehalosa que las plantas que poseían un nivel mas alto de actividad de la trehalasa. Los análogos de la trehalosa, tales como las aminas de la trehalosa se usaron para inhibir la actividad de la trehalasa en los brotes, haciendo posible estudiar los efectos de la trehalosa que se alimenta a las células vegetales. Los brotes de las plantas que producen cantidades relativamente altas de trehalasa fueron afectadas de forma desfavorable por la adición de inhibidores de la trehalasa. La inhibición de la actividad de la trehalasa en homogenados del callo y cultivos de suspensión de diferentes *Angiospermae* usando Validamycin es expuesto por Kendall et al. 1990, Phytochemistry 29, 2525-2582.

El objetivo de la presente invención es proporcionar plantas y partes de plantas capaces de producir y acumular trehalosa, manteniendo dentro de límites aceptables cualquier efecto desfavorable que pueda surgir de la acumulación de trehalosa.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un proceso para producir trehalosa en células vegetales capaces de producir trehalasa haciendo crecer células vegetales que tengan la información genética necesaria para la producción de trehalosa y trehalasa, o cultivando una planta o una parte de la misma que incluya tales células vegetales, caracterizado porque dichas células vegetales se cultivan, o la planta mencionada o parte de la misma, es cultivada en presencia del inhibidor de la trehalasa. Plantas preferentes o partes de plantas o células de las plantas han sido alteradas genéticamente con el fin de que contengan un gen de sintasa de fosfato de trehalosa quimérico en una forma expresible de la planta. Según una ejecución, el mencionado gen de sintasa de fosfato de trehalosa incluye un marco de codificación de lectura abierta de la sintasa de fosfato de trehalosa de la *E. Coli* en forma expresible de la planta.

Según otro aspecto de la invención, las plantas han sido alteradas genéticamente para producir trehalosa preferentemente en ciertos tejidos o partes, tales como (micro-) tubérculos de la patata. Según una ejecución un marco de codificación de lectura abierta de la sintasa de fosfato de trehalosa de la *E. Coli* está más abajo del activador patatin de la patata, para proporcionar las expresiones preferenciales del gen en los



tubérculos y micro- tubérculos de *Solanum tuberosum*.

Según otro aspecto de la invención, las plantas son cultivadas in vitro, por ejemplo en hidrocultivos.

Según otra ejecución preferente, el mencionado inhibidor de la trehalasa incluye validamycin A en forma adecuada para la absorción por dichas células vegetales, preferentemente en una concentración entre 100 nM y 10 mM, preferentemente entre 0,1 y 1 mM, en soluciones acuosas.

La inhibición de trehalasa mencionada la cual es igualmente adecuada, puede formarse mediante la transformación de dicha planta con el gen de sentido opuesto al gen que codifica la información para la trehalasa.

También es adecuado para el inhibidor de la trehalasa la proteína 86 kD de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*). Esta proteína puede ser administrada a la planta de forma adecuada para la absorción, y también es posible que las plantas se transformen con ADN codificando para dicha proteína.

La invención además proporciona las plantas y las partes de las plantas que acumulan trehalosa en cantidades por encima de 0,01% (peso en fresco), preferiblemente de especies de *Solanaceae*, y en particular *Solanum tuberosum* o *Nicotiana tabacum*, en particular un micro-tubérculo de *Solanum tuberosum* que contiene trehalosa.

La invención también incluye la utilización de una planta, o parte de la planta, según la invención para la extracción de la trehalosa, así como la utilización de la misma en un proceso de extracción forzosa de agua de la mencionada planta o parte de la planta. Según otra incorporación de la invención, se proporciona un gen expresible de la planta quimérica, que incluye en una secuencia una región de iniciación de la transcripción que se obtiene del gen, preferentemente expresado en una parte de la planta, particularmente el gen patatin de *Solanum tuberosum*, un índice de 5' no traducido, un marco de lectura abierta codificando una actividad de la sintasa de fosfato de trehalosa, y más abajo del mencionado marco de lectura abierta, una región limitadora transicional.

Según otra ejecución de la invención, se proporciona un gen expresible de la planta quimérica, que incluye en secuencia una región de iniciación de la transcripción que se obtiene del gen, preferentemente expresado en una parte de la planta, particularmente el gen patatin de *Solanum tuberosum*, un índice de 5' no traducido, un marco de lectura abierta que codifica una trehalasa unida en la orientación sin sentido, y más abajo del mencionado marco de lectura abierta, una región limitadora transicional.

Un gen expresible de la planta preferente según la invención, es uno en el cual dicha región limitadora transcripcional se obtiene del gen inhibidor-II de la proteinasa del *Solanum tuberosum*. La invención también proporciona vectores y genomas de plantas recombinantes que incluyen un gen expresible



de la planta quimérica según la invención, así como una célula vegetal que posee un genoma recombinante, una planta o parte de la misma, comprendiendo esencialmente células. Una especie más de plantas preferentes según este aspecto es *Solanum tuberosum*, y un micro-tubérculo del mismo.

- 5 La invención proporciona además un proceso para la obtención de trehalosa, que incluye los pasos de crecimiento de las células vegetales según la invención o cultivando una planta según la invención y extrayendo trehalosa de las células vegetales mencionadas, plantas o partes.

Las siguientes figuras ilustran con más detalle la invención.

10

#### DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del vector binario pMOG799.

Figura 2. Representación esquemática del vector binario pMOG845.

- Figura 3. Representación esquemática de las partes de las vías de acceso biosintéticas de la sacarosa y almidón en tejidos internos de planta. La figura muestra que el carbohidrato producido en la hoja por fotosíntesis es transportado a través del tejido floema en forma de sacarosa. Al penetrar en el interior es descargado por una actividad de la invertasa de enlace de membrana para dejar entrar a la glucosa monoazúcar y fructosa. Estos
- 15 monoazúcares son convertidos en almidón y/o sacarosa por la acción de un número de pasos enzimáticos como se muestra aproximadamente aquí. Los metabolitos de la glucosa G6P y UDPG se cree que son empleados como los sustratos de la enzima TPS suministrados a la planta con la introducción del gen *otsA* expresible. La figura muestra como la cantidad de UDPG y G6P
- 20 disponible como sustrato es aumentada por la reducción de los niveles de las enzimas SPS y AGPase. Su inhibición está marcada con una cruz.

- Figura 4. Alineamientos para la máxima similitud del aminoácido de la trehalasa neutral de *S. cerevisiae* con la trehalasa periplasmática de la *E. Coli*, trehalasa del intestino delgado del conejo y trehalasa del intestino
- 30 medio pupal del gusano de seda, *Bombyx mori*. Los residuos idénticos entre todas las enzimas de la trehalasa se indican en el tipo de letra itálica negrita. Las regiones conservadas de las secuencias del aminoácido estaban alineadas para que coincidieran lo mejor posible. Los huecos en la secuencia del aminoácido están indicados por flechas de puntos.

35

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- Según la presente invención se ha encontrado que la acumulación de un nivel creciente de trehalosa en las plantas y partes de las plantas es posible, sin que cause efectos demasiado drásticos en la viabilidad de
- 40 la planta o partes de la planta. Este descubrimiento importante puede ser explotado adaptando los sistemas de plantas para producir y/o acumular niveles altos de trehalosa a un precio más bajo.



Según una ejecución de la invención la acumulación de los niveles crecientes de trehalosa se lleva a cabo inhibiendo trehalasas endógenas. La inhibición de las trehalasas pueden llevarse a cabo básicamente de dos maneras: por la administración de los inhibidores de la trehalasa de manera exógena, y por la producción de los inhibidores de la trehalasa de manera endógena, por ejemplo transformando las plantas con secuencias de ADN codificando para los inhibidores de la trehalasa.

Según otra ejecución de la invención, los inhibidores de la trehalasa son administrados al sistema de la planta exógenamente. Algunos ejemplos de los inhibidores de la trehalasa que pueden ser utilizados en tales procesos según la invención son la trehazolina producida en *Micromonospora*, cepa SANK 62390 Ando et al., 1991, J Antibiot. 44, 1165-1168, validoxilamina A, B, G, D gluco Dihidrovalidoxilamina A, L-ido-Dihidrovalidoxilamina A, Deoxinojirimicina, (Kameda et al., 1987, J Antibiot. 40 (4), 563-565), 5-epi-trehalozina (Trehalostarina) (Kobayashi Y. et al., 1994, J. Antibiot. 47, 932-938) y castanospermina (Salleh H.M. & Honek J.F. Marzo 1990, FEBS 262 (2), 359-362) y la proteína 86kD de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) (Hayakawa et al., 1989, J. Biol. Chem. 261 (27), 16165-16169). Un inhibidor de la trehalasa preferente según la invención es validamicina A (1, 5, 6-trideoxi-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-5-(hidroximetil)-1-[[4, 5, 6-trihidroxi-3-(hidroximentil)-2-ciclohexon-1-yl]-D-qui-ro-inositol). Los inhibidores de la trehalasa se administran a las plantas o partes de las plantas, o cultivos de células vegetales, de forma adecuada para su absorción por las plantas, las partes o los cultivos. Típicamente el inhibidor de la trehalasa está en forma de solución acuosa de entre 100 nM y 10 mM de ingrediente activo, preferiblemente entre 0,1 y 1 mM. Las soluciones acuosas se pueden aplicar a las plantas o partes de las plantas pulverizándolas sobre las hojas, regando, añadiéndolas al caldo de hidrocultivo, y otros por el estilo. Otra fórmula adecuada de la validamicina es solacol, una fórmula de agricultura comercialmente disponible (Takeda Chem. Indust., Tokio).

Alternativamente, o adicionalmente del empleo de inhibidores de la trehalasa administrados exógenamente, los inhibidores de la trehalasa pueden ser proporcionados introduciendo la información genética, esto es, codificando. Una forma de dicho inhibidor incluido en la trehalasa puede consistir en un constructor genético que causa la producción de ARN el cual es suficientemente complementario a la codificación ARN endógena para la trehalasa como para que reaccione con la mencionada copia exacta endógena, inhibiendo así la expresión de dicha copia exacta. El denominado "acercamiento en sentido opuesto" es bien conocido en este ámbito (vide inter alia EP 0 240 208 A y por los Ejemplos para inhibir SPS expuestos en WO 95/01446).





Un gen que codifica para la trehalasa se ha aislado de la cADN de la patata y se ha hecho secuencia. La secuencia pronosticada de aminoácidos de la trehalosa como se muestra en el NIS: 10 se deriva de la secuencia de nucleótidos representada en el NIS: 9. Como bien se sabe en el campo biológico, las secuencias de aminoácidos de las enzimas equivalentes pueden diferir entre especies. Se subraya que la diferencia entre las secuencias conocidas de la trehalasa y la secuencia de la trehalasa de la planta hace muy cuestionable si tal secuencia de la trehalasa usada en un acercamiento en sentido opuesto es capaz de inhibir la expresión en la planta.

Por supuesto la incorporación mas preferida de la invención se obtiene por la transformación de una planta con el gen en sentido opuesto de la trehalasa el cual encaja exactamente con el gen endógeno de la trehalasa. Sin embargo, las secuencias que tienen un alto grado de similitud pueden ser también usadas. Por lo tanto, el gen en sentido opuesto de la trehalasa que se tiene que usar para la transformación de la patata estará dirigido contra la secuencia de nucleótidos representada en el NIS: 9.

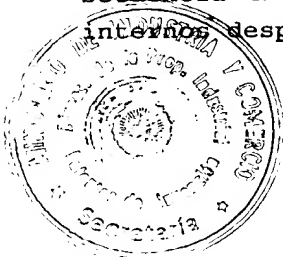
Normalmente basta con expresar solo una parte del gen homólogo en la orientación en sentido opuesto, para llevar a cabo la inhibición eficaz de la expresión de la trehalasa endógena (vide Van der Krol et al., 1990, Plant Molecular Biology, 14, 457-466).

Las secuencias del gen de la trehalasa de otras plantas puede ser aclarado de dos maneras diferentes. Una de las estrategias es usar el clon aislado del cADN de la patata como un medidor para esconder el cADN que contiene el cADN de la especie de planta deseada. Los clones que reaccionan de manera positiva pueden ser aislados entonces y subclonados en vectores adecuados.

Una segunda estrategia para identificar dichos genes es por la purificación de las proteínas que forman parte de la degradación de la trehalosa.

Un ejemplo de dicha estrategia es la purificación de una proteína con ácido de actividad invertasa de la patata (*Solanum tuberosum* L.) tubérculos (Burch et al., Phytochemistry, Vol. 31, No. 6, pp. 1901-1904, 1992). La preparación de la proteína que se obtiene también presenta actividad hidrolizadora de la trehalosa. La actividad hidrolizadora de los disacáridos de las preparaciones de proteínas obtenidas después de los pasos de la purificación, puede ser monitorizada según lo describe Dahlqvist (Analytical Biochemistry 7, 18-25, 1964).

Después de purificar la(s) proteína(s) con la actividad hidrolizadora de la trehalosa para la homogeneidad, se determina la secuencia N-terminal del aminoácido o la secuencia de los fragmentos internos después de la digestión de la proteína. Estas secuencias permiten



que los diseños de los medidores de oligonucleótidos que se utilizan en una reacción en cadena de polímeros (PCR) o en experimentos de hibridación, aislen las correspondientes mRNA usando técnicas estándar de clonación molecular.

- 5                   Un cADN aislado codificando una enzima degradante de trehalosa está por lo tanto fusionado a una secuencia de activador de tal manera que la transcripción resulta como la síntesis de un mRNA en sentido opuesto.

- 10                   Otra forma de dicho inhibidor incorporado de la trehalasa puede consistir de una construcción genética que causa la producción de una proteína que es capaz de inhibir la actividad de la trehalasa en las plantas. Un inhibidor proteínico de la trehalasa se ha aislado y purificado del suero de las cucarachas americanas adultas descansando (*Periplaneta americana*) (Hayakawa et al., *supra*). Esta proteína, de la cual se ha descrito parcialmente su secuencia en dicha publicación, puede hacerse  
15                   expresable por el aislamiento del gen que codifica para la proteína, la fusión del gen a un activador adecuado, y la transformación de dicho gen fusionado en la planta de acuerdo a métodos biológicos moleculares estándar.

Se puede seleccionar un activador de cualquier gen capaz de conducir la transcripción en las células vegetales.

- 20                   Si la acumulación de trehalosa solamente se quiere en ciertas partes de las plantas, tales como los tubérculos (mini-) de la patata, la construcción del ADN inhibidor de la trehalasa (por ejemplo, la construcción en sentido opuesto) incluye un fragmento del activador que preferentemente se expresa en los (mini-) tubérculos, permitiendo que los niveles de  
25                   trehalasa endógena en el resto de las células de la planta no sean afectados de manera significativa. De este modo, cualquier efecto negativo de la trehalosa en las células vegetales vecinas debido a la difusión de la trehalosa, se contrarresta por la actividad de la trehalasa endógena que no está afectada en el resto de la planta.

- 30                   En el ejemplo que ilustra la invención, donde la sintasa de fosfato de trehalosa se produce bajo el control del fragmento del activador del patatin, también la construcción inhibidora de la trehalasa puede incluir un fragmento del activador del gen del patatin.

- Habiéndose hecho los cambios necesarios, si la trehalosa se  
35                   tiene que acumular en el fruto del tomate, se tienen que utilizar tanto un gen de sintasa de fosfato de trehalosa expresible de la planta, el que es al menos expresado en el tomate, como una construcción de ADN inhibidora de la trehalasa expresible vegetal, que debe estar expresada preferentemente en el fruto, y no preferentemente, o no substancialmente, fuera del fruto.  
40                   Un ejemplo de un fragmento del activador que puede usarse para conducir la expresión de las construcciones del ADN preferentemente en el fruto del tomate está expuesto en EP 0 409 629 A1. Muchas modificaciones de este



aspecto de la invención, que no se apartan de la finalidad de esta invención, las están concibiendo personas que tienen aptitudes normales en el campo de esta invención.

Un método alternativo para bloquear la síntesis de la actividad enzimática que no se desea, tal como la que es causada por la trehalasa endógena es la introducción en el genoma de la muestra vegetal de una copia adicional del mencionado gen de trehalasa endógena. Se observa a menudo que la presencia de una copia del transgen de un gen endógeno apaga la expresión tanto del gen endógeno como del transgen (EP 0 465 572 A1).

Según una ejecución de la invención, la acumulación de trehalosa es producida en plantas donde la capacidad de producción de trehalosa ha sido incorporada por la introducción de una construcción de gen expresible de la planta codificando la sintasa de fosfato de trehalosa (TPS).

Se puede emplear cualquier gen de sintasa de fosfato de trehalosa bajo el control de elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en las células vegetales, bien específicamente o constitutivamente, siempre que éste sea capaz de producir una actividad de sintasa de fosfato de trehalosa. Un marco de lectura abierta preferente según la invención es el que codifica una enzima TPS como se representa en NUMERO DE IDENTIFICACION DE SECUENCIA (NIS): 2. Se sabe bien que mas de una secuencia de ADN puede codificar una enzima idéntica, lo cual es causado por la degeneración del código genético. Si se desea, el marco de lectura abierta que codifica la actividad de sintasa de fosfato de trehalosa se puede adaptar al uso de codon en la muestra vegetal que elijamos, pero esto no es necesario.

La secuencia del ácido nucléico aislado representado por NIS: 2, se puede usar para identificar las actividades de sintasa de fosfato de trehalosa en otros organismos y por lo tanto aislando y clonándolos, por la hibridación del ADN de otras fuentes con un fragmento de ADN- o ARN que se obtiene del gen de *E. Coli*. Es preferible que dichas secuencias de ADN se protejan por hibridación bajo unas condiciones mas o menos rigurosas (tales como temperatura y fuerza iónica de la mezcla de hibridación). Que las condiciones sean rigurosas o no, también depende de la naturaleza de la hibridación, esto es ADN:ADN, ADN:ARN, ARN:ARN, así como la longitud del fragmento mas corto de hibridación. Los que tienen cierta aptitud en éste ámbito son capaces de establecer un régimen de hibridación lo suficiente riguroso como para aislar los genes TPS, mientras que se evita una hibridación específica. A medida de que se va disponiendo de los genes relacionados con la síntesis de la trehalosa de otras fuentes se hacen disponibles, estos pueden ser usados de manera similar para obtener un gen de sintasa de fosfato de trehalosa expresible de la planta según la invención.



Las fuentes para el aislamiento de las actividades de sintasa de fosfato de trehalosa incluyen micro-organismos (por ejemplo, bacterias, levadura, hongos), plantas, animales, y otros por el estilo. Secuencias de ADN aisladas que codifican la actividad de fosfato de trehalosa de otras  
5 fuentes, se pueden usar igualmente en un método para la producción de trehalosa según la invención. Como ejemplo, los genes para la producción de trehalosa de la levadura se exponen en W093/17093.

La invención también incluye las secuencias de ácido nucleico que se han obtenido modificando la secuencia de ácido nucleico representada  
10 en NIS: 2 mutando uno o mas codones para que así resulte en cambios de aminoácidos en la proteína codificada, siempre y cuando la mutación de aminoácidos no anule enteramente la actividad de sintasa de fosfato de trehalosa.

Según otra ejecución de la invención, las plantas se cambian  
15 genéticamente para que se produzca y acumule trehalosa en partes específicas de la planta, las cuales se seleccionaron en base a consideraciones tales como disponibilidad del sustrato para la enzima TPS, insensibilidad de la parte de la planta a cualquier efecto negativo supuesto de la trehalosa en las células vegetales que funcionan, y otras por el estilo. Un emplazamiento  
20 preferente de la expresión de la enzima TPS son las partes de la planta de almacenamiento de almidón. Los micro-tubérculos de la patata en particular se consideran como partes adecuadas de las plantas. Se puede obtener de la región hacia arriba del marco de lectura abierta del gen del patatin de la patata (*Solanum tuberosum*) un activador preferente para llevar a cabo la  
25 expresión selectiva de la enzima TPS en micro-tubérculos y tubérculos de la patata.

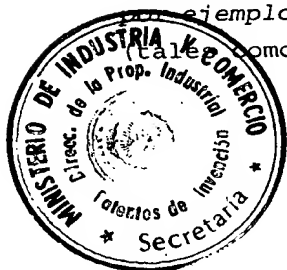
Las plantas pueden ser además modificadas introduciendo genes adicionales que codifican las fosfatasa las cuales son capaces de convertir el fosfato de trehalosa en trehalosa. Por lo menos en los tubérculos o  
30 micro-tubérculos de las patatas, las hojas de la patata y en las hojas y raíces del tabaco, la actividad de la fosfatasa endógena parece estar presente, por lo tanto la introducción del gen de la fosfatasa de fosfato de trehalosa (TPP) no es completamente necesario.

Según otra ejecución de la invención, la acumulación de  
35 trehalosa es además reforzada por la inhibición de genes endógenos para que así se refuerce la disponibilidad del sustrato para la sintasa de fosfato de trehalosa, como se pone de ejemplo aquí con la inhibición del gen de sintasa de fosfato de sacarosa endógeno y el gen pirofosforilasa ADP-glucosa (AGP-asa). La inhibición de la actividad de la enzima endógena no deseable  
40 se lleva a cabo de maneras diferentes, y la elección de la misma no es para la invención. Preferentemente, la inhibición del gen se lleva a cabo a través del llamado "acercamiento en sentido opuesto". Aquí se



expresa una secuencia de ADN la cual produce un ARN que por lo menos es parcialmente complementario al ARN que codifica la actividad enzimática que se tiene que bloquear (por ejemplo, AGP-asa o SPS, (Sintasa de Fosfato de Sacarosa, en los ejemplos). Es preferible usar genes homólogos en sentido opuesto porque estos son mas sensibles que los genes heterólogos. El aislamiento de la patata de un gen SPS en sentido opuesto utilizando una secuencia de gen-SPS del maíz como medidor sirve para ilustrar la viabilidad de esta estrategia. No hace falta indicar que, para practicar la invención se necesita el uso de fragmentos en sentido opuesto homólogos. Un método alternativo para bloquear la síntesis de actividades enzimáticas no deseables es la introducción en el genoma de la muestra vegetal de una copia adicional de un gen adicional presente en la muestra vegetal. A menudo se observa que dicha copia adicional de un gen silencia el gen endógeno: este efecto es mencionado en la bibliografía como el efecto co-supresivo, o co-supresión. Los detalles de la invención de reforzar la disponibilidad del sustrato se proporcionan en los Ejemplos de WO 95/01446, que aquí se incluyen en la referencia.

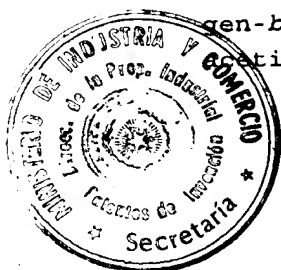
Las muestras vegetales preferentes entre las *spermatophyta* son las *Angiospermae*, notablemente las *Dicotyledoneas*, incluyendo entre otras las *Solanaceae* como una familia representante, y las *Monocotyledoneas*, incluyendo entre otras las *Gramineas* como familia representante. Las plantas huésped adecuadas, como son definidas en el contexto de esta invención, incluyen plantas (así como también partes y células de dichas plantas) y su progenie la cual ha sido modificada genéticamente utilizando técnicas de ADN recombinante para que causen o refuercen la producción de trehalosa en la planta deseada o en el órgano de la planta; estas plantas se pueden utilizar directamente (por ejemplo: las especies de plantas que producen partes comestibles) en la invención o la trehalosa puede ser extraída y/o purificada de dicho huésped. Los cultivos con partes comestibles de acuerdo a la invención incluyen aquellas que tienen flores como la coliflor (*Brassica oleracea*), alcachofas (*Cynara scolymus*), frutas como la manzana (*Malus, por ejemplo domesticus*), plátano (*Musa, por ejemplo, acuminata*), bayas (tales como la grosella, *Ribes, por ejemplo rubrum*), cerezas (tales como la cereza dulce, *Prunus, por ejemplo avium*), pepino (*Cucumis, por ejemplo sativus*), uvas (*Vitis, por ejemplo vinifera*), limón (*Citrus limon*), melón (*Cucumis melo*), nueces (tales como la nuez, *Juglans, por ejemplo regia*) cacahuetes, (*Arachis Hypogaeae*), naranja (*Citrus, por ejemplo maxima*), melocotón (*Prunus, por ejemplo persica*), pera (*Pyra, por ejemplo communis*), pimiento (*Solanum, por ejemplo capsicum*), ciruela (*Prunus, por ejemplo domestica*), fresa (*Fragaria, por ejemplo moschata*), tomate (*Lycopersicon, por ejemplo esculentum*), hojas, tales como la alfalfa (*Medicago sativa*), col (tal como *Brassica oleracea*), endivias (*Cichoreum, por ejemplo endivia*),



puerro (*Allium porrum*), lechuga (*Lactuca sativa*), espinaca (*Spinacia oleracea*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), raíces, tales como arruruz (*Maranta arundinacea*), remolacha (*Beta vulgaris*), zanahoria (*Daucus carota*), mandioca (*Manihot esculenta*), nabo (*Brassica rapa*), rábano (*Raphanus sativus*), batata (5 *Dioscorea esculenta*), batata (*Ipomoea batatas*) y semillas, tales como judía (*Phaseolus vulgaris*), guisante (*Pisum sativum*), soja (*Glycin max*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), tubérculos, tales como kohlrabi (*Brassica oleracea*), patata (*Solanum tuberosum*), y otros por el estilo. Las partes comestibles pueden 10 conservarse secándolas en presencia de niveles de trehalosa reforzados producidos dentro debido a la presencia de un gen de sintasa de fosfato de trehalosa expresible vegetal.

El método de introducir el gen de sintasa de fosfato de trehalosa expresible vegetal, o cualquier otro gen con sentido o en sentido 15 opuesto dentro de una célula vegetal recipiente no es crucial, siempre y cuando sea expresada en dicha célula vegetal. El uso de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* - se prefiere mediante transformación, pero hay disponibles otros procedimientos para la introducción del ADN en las células de las plantas. Los ejemplos son la transformación de los 20 protoplastos usando el método de glicol calcio/polietileno, la microinyección por electroporosis y el bombardeo de partículas de ADN recubiertas (Potrykus, 1990, Bio/technol. 8, 535-542). También se pueden utilizar las combinaciones de *Agrobacterium* y el bombardeo de partículas revestidas. También se pueden usar los protocolos de transformación que incluyen otros 25 vectores vivos además de *Agrobacterium*, tales como vectores víricos (por ejemplo del virus Mosaico de la Coliflor (CaMV)) y o combinaciones de *Agrobacterium* y vectores víricos, una invención que se menciona como agroinfección (Grimsley N. et al., 8 Enero 1987, Nature 325, 177-179). Después de la selección y/o protección, los protoplastos, células o partes 30 de la planta que hayan sido transformadas se regeneran en plantas enteras, usando métodos conocidos en este ámbito (Horsch et al., 1985, Science 225, 1229-1231).

El desarrollo de los sistemas de cultivo de tejidos reproducibles para los cultivos de monocotiledoneas, junto con los métodos para la 35 introducción de material genético en las células de las plantas ha facilitado la transformación. Actualmente, los métodos preferentes para la transformación de las especies de monocotiledoneas son el bombardeo de micro-proyectiles de "explants" o células en suspensión, y la absorción directa de ADN o electroporosis (Shimamoto, et al., 1989, Nature 338, 274-40 276). Las plantas transgénicas del maíz se han obtenido introduciendo el gen-bar *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica la fosfinotricina tiltransferasa (un enzima que inactiva la fosfinotricina herbicida),



dentro de las células embriogénicas de un cultivo en suspensión de maíz por bombardeo de micro-proyectiles (Gordon-Kamm, 1990, Plant Cell, 2, 603-618). Se ha informado de la introducción de material genético en los protoplastos de aleurone de otro cultivo de monocotiledoneas tales como el trigo y cebada (Lee, 1989, Plant Mol. Biol. 13, 21-30). Las plantas del trigo han sido regeneradas de un cultivo en suspensión embriogénica seleccionando solamente los tejidos compactos por la edad y los del callo embriogénico nodular para el establecimiento de los cultivos en suspensión embriogénica (Vasil, 1990 Bio/technol. 8, 429-434).

10 Las plantas monocotiledoneas, incluyendo los cultivos comercialmente importantes tales como maíz y arroz pueden ser obtenidos por la transformación mediante *Agrobacterium* según Gould J, Michael D, Hasegawa O, Ulian EC, Peterson G, Smith RH, (1991) Plant. Physiol. 95, 426-434; Hiei Y. et al., The Plant Journal 6 (2), 271-282 patente Europea 159 418 B1.

15 Las secuencias de ADN adecuadas para el control de la expresión de los genes expresibles de las plantas (incluyendo los genes marcadores), tales como regiones de iniciación transcripcional, reforzadores, índices no transcritos y otros por el estilo, se pueden derivar de cualquier gen que esté expresado en una célula de planta. También son deseados los activadores  
20 híbridos que combinan las porciones funcionales de varios activadores, o equivalentes sintéticos de los mismos. Aparte de los activadores constitutivos, los activadores que inducen, o los activadores que de otra manera son regulados en su patrón de expresión, por ejemplo en lo que se refiere al desarrollo o al tipo de célula específico, pueden ser usados para controlar  
25 las expresiones de los genes expresibles de las plantas según la invención siempre y cuando estén expresados en las partes de las plantas que contienen sustrato para la TPS.

Para seleccionar o proteger las células transformadas, es preferible incluir un gen marcador unido al gen expresible de la planta  
30 según la invención para ser transferido a una célula vegetal. La elección de un gen marcador adecuado en la transformación de la planta entra bien dentro del objetivo del trabajador medio con habilidad; algunos ejemplos de genes marcadores que se usan por rutina son los genes neomicine fosfotransferasa dando resistencia a kanamicine (EP-B 131 623), el gen Glutathione-S-  
35 transferasa del hígado de rata dando resistencia a los herbicidas derivados del glutathione (EP-A 256 223), glutamina sintetasa dando una resistencia de sobre-expresión a los inhibidores de la sintetasa glutamina tales como fosfinotricina (WO87/05327), el gen acetil transferasa de *Streptomyces*  
Viridochromogenes dando resistencia al agente selectivo fosfinotricina (EP-A 275 2957), el gen que codifica la sintasa 5-enolshikimate-3 fosfato (EPSPS) dando tolerancia a N-fosfonometilglicina, el gen bar dando resistencia  
contra Bialaphos (por ejemplo WO91/02071) y otros por el estilo. La elección



real del marcador no es crucial siempre que sea funcional (por ejemplo selectiva) en combinación con las células de las plantas de elección.

El gen marcador y el gen de interés no tienen que estar unidos, porque la co-transformación de los genes desunidos (Patente U.S. 4,399,216) es también un proceso eficaz en la transformación de las plantas.

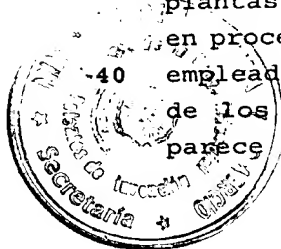
El material vegetal preferente para la transformación, especialmente para los cultivos de dicotiledoneas, son discos de hojas los cuales se pueden transformar y tienen una buena capacidad de regeneración (Horsch R.B. et al., (1985) Science 227, 1229-1231).

Es sustancial para la invención como se lleva a efecto la presencia de dos o más genes en la misma planta. Esto puede, entre otras formas, ser llevado a cabo con uno de los siguientes métodos:

- (a) la transformación de la línea de la planta con una construcción multigen que contiene más de un gen a ser introducido,
- (b) las construcciones de co-transformación diferentes en la misma línea de la planta simultáneamente,
- (c) rondas posteriores de transformación de la misma planta con los genes a introducir,
- (d) cruzando dos plantas cada una conteniendo un gen diferente para que sea introducido en la misma planta, o
- (e) combinaciones de los mismos.

El ámbito de aplicación de la invención se basa tanto en la agricultura como en la horticultura, por ejemplo debido a las propiedades mejoradas de las plantas modificadas como tales (por ejemplo tolerancia a la tensión, tal como tolerancia al frío, y preferentemente resistencia a la sequía, y aumento en la calidad después del cultivo y la auto-vida de las plantas y los productos de las plantas), así como en cualquier forma de industria donde la trehalosa es o será aplicada en un proceso de extracción forzosa de agua, tal como secado o secado por congelación. La trehalosa puede ser usada o vendida como tal, por ejemplo en forma purificada o en mezclas, o en forma de producto de plantas, tanto como tubérculos, como fruto, como flor conteniendo la trehalosa, bien en estado nativo o en (parcialmente) forma deshidratada, y similares. Las partes de las plantas que albergan (niveles que aumentan de) fosfato de trehalosa o trehalosa pueden ser usadas o vendidas como tales o procesadas sin necesidad de añadir trehalosa.

También la trehalosa puede extraerse y/o purificarse de las plantas o partes de las plantas que la producen y ser posteriormente usadas en procesos industriales. En la industria alimentaria la trehalosa puede ser empleada añadiendo trehalosa a los alimentos antes del secado. El secado de los alimentos es un método importante de conservación. La trehalosa parece ser muy útil para conservar alimentos a través del secado por aire





tradicional, y para permitir la reconstitución rápida por la adicción de agua de un producto de alta calidad (Roser et al., Julio 1991, Trends in Food Science and Technology, pp. 166-169). Los beneficios incluyen la retención de sabores/fragancias naturales, sabor a producto fresco, y valor nutritivo (proteínas y vitaminas). Se ha demostrado que la trehalosa tiene la facultad de estabilizar las proteínas, por ejemplo vacunas, enzimas y membranas, y formar un cristal estable y químicamente inerte. La baja actividad del agua de los productos muy secos previene las reacciones químicas, que podían ser causa de que se estropearan.

Los campos de cultivos como el maíz, mandioca, patata, remolacha y azúcar han sido, desde hace mucho tiempo, usados como una fuente natural para la producción en masa de carbohidratos (almidones y sacarosa). La producción de trehalosa en dichos cultivos, facilitada por la ingeniería genética de la vía de acceso biosintética de la trehalosa en estas especies de plantas, permitiría la explotación de dichos cultivos para la producción de trehalosa.

La trehalosa también se usa en el secado o almacenamiento de las macromoléculas biológicas, tales como péptidos, enzimas, polinucleótidos y similares.

Todas las referencias citadas en esta especificación son indicativas del nivel de habilidad en el ámbito al que se refiere esta invención. Todas las publicaciones, ya sean patentes o no, referenciadas antes o después en esta especificación se incorporan aquí como referencia como si cada una de ellas fuera incorporada individualmente como referencia. En particular el documento WO 95/01446, citado aquí, que describe la producción de trehalosa en las plantas mas complejas por manipulación genética se incorpora aquí como referencia.

Los ejemplos dados a continuación ilustran la invención y de ninguna manera pretenden indicar los límites de la finalidad de la invención.

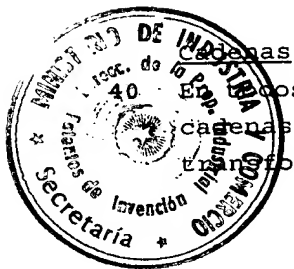
#### Experimental

##### Manipulaciones del ADN

Todos los procesos del ADN (aislamiento del ADN de E. Coli, restricciones, unión, transformación, etc.) se llevan a cabo según los protocolos estándar (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Nueva York).

##### Cadenas

En todos los ejemplos la cadena de E. Coli K-12 DH5- se usa para clonar. Las cadenas de Agrobacterium tumefaciens usadas para los experimentos de transformación de plantas son EHA 105 y MOG 101. (Hood et al., Trans.



Research 2, 208-218).

#### Construcción de la cadena MOG101 de Agrobacterium

Un sistema de vector binario (Hoekema A., Hirsch, P.R.,  
5 Hooykaas, P.J.J., y Schilperoort, R.A. (1983) Nature 303, 179) se usa para transferir construcciones de genes dentro de las plantas de la patata y del tabaco. El plásmido auxiliar que provoca las funciones virulentas del *Agrobacterium tumefaciens* se deriva de la octina Ti-plásmido pTiB6. El MOG101 es una cadena del *Agrobacterium tumefaciens* que lleva un Ti-plásmido  
10 no oncogénico (Koekman et al., 1982, *supra*) de la cual se borra toda la región T y se substituye por un marcador de resistencia de la bacteria Spectinomina del transposon Tn1831 (Hooykaas et al., 1980 Plasmid 4, 64-75). El Ti-plásmido pTiB6 contiene dos regiones T adyacentes, TL (T-izquierda) y TR (T-derecha). Para obtener un derivado que no tenga las  
15 regiones TL y TR, se construyó un vector intermedio pMOG579. El plásmido pMOG579 es un derivado pBR322 que contiene 2 fragmentos Ti-plásmidos homólogos a los fragmentos situados a la izquierda y a la derecha por fuera de las regiones T del pTiB6. Los 2 fragmentos están separados en pMOG579 por un fragmento de 2,5 kb BamHI - HindIII del transposon Tn1831 (Hooykaas et  
20 al., 1980 Plasmid 4, 64-75) y que lleva el marcador de resistencia de la spectinomina. El plásmido se introduce en la cadena de *Agrobacterium tumefaciens* LBA1010 [C58-C9 (pTiB6) = una cadena curada C58 en la cual se introduce el pTiB6 (Koekman et al., 1982, *supra*), por apareamiento triparental de la *E. Coli*, usando HB101 8pRK2013 como auxiliar. Se  
25 seleccionan los transconjugantes para la resistencia de la Rifampicina (20 mg/1) y la espectinomicina (250 mg/1). El resultado fue una doble recombinación entre pMOG579 y pTiB6 que perdió la resistencia de la carbenicilina (el marcador pBR322) y la eliminación de toda la región T. De 5000 réplicas de los transconjugantes resistentes de la espectinomicina cultivado en placa  
30 en la carbenicilina (100 mg/1), 2 se encontraron como sensibles. El análisis del sur (no se muestra) demostró que una caso de sobrecruzamiento doble había eliminado toda la región T. La cadena resultante se llama MOG101. Esta cadena y su construcción es análoga a la cadena GV2260 (Deblaere et al., 1985, Nuvl. Acid Res. 13, 4777-4788).

35 Una cadena de auxiliar alternativo para MOG101 es por ejemplo LBA4404; esta cadena también puede usarse adecuadamente para la instrucción de un plásmido binario, tal como pMOG799 y la posterior transformación de la planta. Otras cadenas de auxiliares adecuados están ya disponibles.

#### Aislamiento del activador/construcción del patatin de pMOG546

El fragmento del activador del patatin es aislado del ADN del cromosoma de *Solanum tuberosum* cv. Bintje usando la reacción de la cadena del polímero.



Se sintetizan una serie de oligonucleótidos, complementarios a la secuencia de la región hacia arriba del gen del patatin -pat21 (Bevan, M., Barker, R., Goldsbrough, A., Jarvis, M., Kavanagh, T., e Iturriaga, G. (1986) Nucleic Acids Res. 14: 5564-5566), que consisten en las siguientes secuencias:

5

5' AAG CTT ATG TTG CCA TAT AGA GTA G 3' PatB33.2 (NIS:3)  
5' GTA GTT GCC ATG GTG CAA ATG TTC 3' Patatg.2 (NIS:4)

Estos elementos se usan para amplificar PCR un fragmento de ADN de 1123bp, usando ADN del cromosoma aislado de la patata cv Bintje como modelo. El fragmento amplificado muestra un alto grado de similitud con la secuencia del patatin -pat21 y es clonado usando enlaces EcoRI, un vector pUC18 que resulta del plásmido pMOG546.

15

#### Construcción del pMOG 799

El pMOG 799 alberga el gen TPS de la E. Coli que está bajo el control de un doble activador del Mosaico de la Coliflor 35S reforzado. La construcción de este vector binario se describe con detalle en la solicitud de la patente Internacional PCT/EP94/02167, incorporada aquí como referencia. Una muestra de una cadena de E. Coli albergando pMOG799 ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en el Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Oosters-  
straat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda, el Lunes 23 de Agosto, 1993:  
El Número de Solicitud dado por la Institución Depositaria Internacional es CBS 430.93.

#### Construcción de pMOG845

El plásmido pMOG546 que contiene el activador del patatin se digiere con NcoI-KpnI, incubado con polimerasa I del ADN de E. Coli en presencia de dATP y dCTP por lo tanto destruyendo la situación del NcoI y KpnI y posteriormente vuelta a formarse. Del vector resultante, un fragmento de 1,1kb EcoRI-SmaI que contiene el activador del patatin, se aísla y clona en pMOG798 (descrito en detalle en PCT/EP94/02167) linearizado con SmaI-EcoRI y por consiguiente intercambiando el activador 35S CaMV por el activador del patatin. El vector resultante está linearizado con HindIII y unido con el siguiente duplo de oligonucleótidos:

(HindIII)	PstI	KpnI	HindIII
AGCT CTGCAG TGA GGTACC A		3'	TVC 11 (NIS:5)
GACGTC ACT CCATGG TTCGA		5'	TVC 12 (NIS:6)



Después de comprobar la orientación del duplo del oligonucleótido introducido, el vector resultante está linearizado con PstI-HindIII seguido de la inversión de un fragmento 950bp PstI-HindIII albergando el inhibidor II terminador de la proteinasa de la patata (PotPiII) (An, G., Miltra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. y Ryan, C.A. (1989) The Plant Cell 1: 115-122) El terminador PotPiII es aislado por la amplificación PCR usando ADN del cromosoma aislado de la patata cv. Desiree como modelo y el siguiente conjunto de oligonucleótidos:

10 5' GTACCCTGCAGTGTGACCCTAGAC 3' TVC 15 (NIS:7)  
5' TCGATTCATAGAAGCTTAGAT 3' TVC 16 (NIS:8)

El porta-isótopos de la expresión TPS es posteriormente clonado como un fragmento de EcoRI-HindIII dentro del vector binario pMOG402 que resulta de pMOG845 (fig. 4). Una muestra de la cadena Dh- de *E. Coli*, albergando pMOG845 ha sido depositada en el Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda, el 4 de Enero, 1995; El Número de Solicitud dado por la Institución Depositaria Internacional es CBS 101.95.

20

#### Apareamientos triparentales

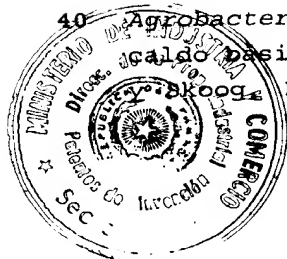
Los vectores binarios se movilizan en apareamientos triparentales con la cadena de *E. Coli* HB101 que contiene el plásmido pRK2013 (Ditta G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D.R. et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7347) en la cadena de *Agrobacterium tumefaciens* MOG101 o EHA105 y se usa para la transformación.

#### Transformación del tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1)

El tabaco se transforma por el co-cultivo de tejido de la planta con la cadena de *Agrobacterium tumefaciens* MOG101 que contiene el vector binario que nos interesa como se ha descrito. La transformación se lleva a cabo usando el co-cultivo de discos de las hojas del tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) como se describe por Horsch et al., 1985, Science 227, 1229-1231. Las plantas transgénicas se regeneran de los brotes que crecen en un caldo de cultivo elegido que contiene kanamicina, que se ha enraizado y transferido a la tierra.

#### Transformación de la patata

La patata (*Solanum tuberosum* cv. Kardal) se transforma con la cadena de *Agrobacterium* EHA 105 que contiene el vector binario que nos interesa. El caldo básico de cultivo es MS3OR3 que consiste en sales MS (Murashige, T. F. )1962) Physiol. Plan. 14, 473), vitaminas R3 (Ooms et al.,



(1987) Theor. Appl. Genet. 73, 744), 30 g/l sacarosa, 0,5 g/l MES con un pH final de 5,8 (ajustado con KOH) solidificado cuando sea necesario con 8g/l de agar de Daichin. Los tubérculos de la *Solanum tuberosum* cv. Kardal se pelan y se esteriliza la superficie quemándolos en etanol al 96% durante 5 segundos. Se apagan las llamas en agua esterilizada y se cortan rodajas de 2 mm. de grosor aproximadamente. Los discos se cortan con un agujero en el tejido vascular y se incuban durante 20 minutos en el caldo de cultivo MS30R3 que contiene  $1-5 \times 10^8$  bacteria/ml de *Agrobacterium* EHA 105 que contiene el vector binario. Se lavan los discos del tubérculo con el caldo de cultivo MS30R3 y se transfieren a un caldo post-cultivo solidificado (PM). El PM constituye el caldo de cultivo M30R3 complementado con 3,5 mg/l de ribosido de zeatina y 0,03 mg/l de ácido acético indol (IAA). Después de dos días, los discos se cambiaron al caldo de cultivo fresco PM con 200 mg/l de cefotaxim y 100 mg/l de vancomicina. Tres días después, los discos de los tubérculos se transfirieron a un caldo de inducción de brotes (SIM) que constituye el caldo de cultivo PM con 250 mg/l de carbenicilina y 100 mg/l de kanamicina. Después de 4-8 semanas, los brotes que salían de los discos de cortaron y se pusieron en un caldo de radicación (MS30R3 con 100 mg/l de cefotaxim, 50 mg/l de vancomicina y 50 mg/l de kanamicina). Los brotes se propagaron en forma de áxeno por cortes del meristemo.

#### Inducción de los micro-tubérculos

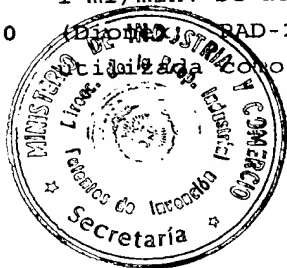
Los segmentos del tallo de plantas de la patata *in vitro* albergando un meristemo auxiliar se transfieren al caldo de inducción de los micro-tubérculos. El caldo de inducción de los micro-tubérculos contiene sales 1 x MS complementadas con vitaminas R3, 0,5 g/l de MES (pH final 5,8, ajustado con KOH) y solidificado con 8 g/l de agar de Daishin, 60 g/l de sacarosa y 2,5 mg/l de kinetin. Después de 3 a 5 semanas de crecimiento en la oscuridad a 24°C, los micro-tubérculos están formados.

30

#### Ensayo de la trehalosa

La trehalosa se determinó cuantitativamente por la cromatografía del intercambio aniónico con detección amperométrica por impulsos. Se prepararon los extractos añadiendo 1 ml de agua hirviendo a 1 g de material congelado el cual posteriormente se calentó durante 15' a 100°C. Las muestras (25 µl) fueron analizadas en un cromatógrafo líquido Dinex DX-300 equipado con una columna PA-1 de carbopac de 4 x 250 mm Dionex 35391 y una pre-columna PA-1 de carbopac de 4 x 50 mm Dionex 43096. La elución fue con 100 mM de NaOH a 1 ml/min. Se detectaron azúcares con un detector amperométrico por impulsos (Dionex PAD-2). La trehalosa disponible comercialmente (Sigma) fue utilizada como un estándar.

40



#### Aislamiento de la Validamicina A

- La Validamicina A es aislada del Solacol, una fórmula de agricultura comercial (Takeda Chem. Indust., Tokio) como se describe por Kendall et al., (1990) Phytochemistry, Vol. 29, No. 8, pp. 2525-2528. La invención incluye
- 5 la cromatografía de cambio de iones (QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia), vol. de base 10 ml, compensador de equilibrio 0,2 mM Na-Pi ph 7) del 3% de una fórmula de agricultura de Solacol. Cargando 1 ml de Solacol en la columna y eluyendo con agua en 7 fracciones, prácticamente toda la Validamicina es recuperada en la fracción 4.
- 10 Basado en una recuperación al 100%, utilizando esta invención, la concentración de Validamicina A era ajustada a  $110^{-3}$  M en compensador MS, para usarse en las pruebas de acumulación de trehalosa.
- Alternativamente, la Validamicina A y B pueden ser purificadas directamente del *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus*, como se describe por Twasa T. et al., 1971, en The Journal of Antibiotics 24 (2), 119-123. cuyo contenido
- 15 se añade aquí como referencia.

#### Construcción de pMOG1027

- El pMOG1027 alberga el gen de la trehalasa de *Solanum tuberosum* cv. Karda
- 20 en la orientación invertida bajo el control del doble activador reforzado 35S de Mosaico de la Coliflor. La construcción de este vector es muy similar a la construcción del pMOG799 y puede ser realizada por cualquier persona experta en el campo. Después de la movilización de este vector binario por apareamiento triparental con *Agrobacterium*, esta cadena puede ser usada para
- 25 transformar las células de la planta y para generar plantas transgénicas teniendo niveles reducidos de actividad de la trehalasa.

#### Construcción de pMOG1028

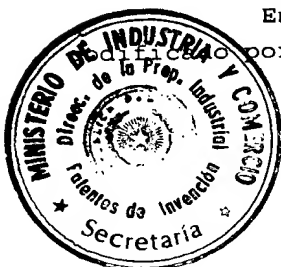
- El pMOG1027 alberga el gen de la trehalasa de *Solanum tuberosum* cv. Karda
- 30 en la orientación invertida bajo el control del activador del tubérculo específico del patatin. La construcción de este vector es muy similar a la construcción del pMOG845 y puede ser realizada por cualquier persona experta en el campo. Después de la movilización de este vector binario por apareamiento triparental con *Agrobacterium*, esta cadena puede ser usada en
- 35 los experimentos de la transformación de la patata para generar plantas transgénicas teniendo niveles reducidos de actividad de la trehalasa en los tejidos de los tubérculos.

#### EJEMPLO I

40

#### Clonación de un gen con toda su longitud de E. Coli otsA

En la E. Coli, la sintasa de fosfato de trehalosa (TPS), está codificada por el gen otsA situado en el operón otsBA. La determinación de



clonación y secuencia del gen *otsA* se describe en detalle en el Ejemplo I de PCT/EP94/02167, aquí añadido por la referencia. Para efectuar su expresión en células de plantas, el marco de lectura abierta se ha unido a los elementos reguladores transcripcionales del activador CaMV 35S del ARN, el reforzador transcripcional del índice ALMV, y el terminador transcripcional del gen NOS, como se describe con mayor detalle en el Ejemplo I de PCT/EP94/02167.

Un vector binario, pMOG799 (Fig. 1), que contiene el gen *otsA* expresible de la planta y el gen de resistencia de kanamicina como un marcador seleccionable entre los bordes T-ADN, es utilizado para transformar la patata y el tabaco.

## EJEMPLO 2

### Producción de trehalosa en las plantas del tabaco transformadas con pMOG799

15

Los discos de las hojas del tabaco son transformados con el vector binario pMOG799 usando *Agrobacterium tumefaciens*. Los brotes transgénicos son seleccionados en kanamicina. Las plantas transgénicas son transferidas al invernadero para que florezcan y dejen las semillas después de polinizarse (S1). Las semillas de estas plantas transgénicas son esterilizados en su superficie y germinadas *in vitro* en un caldo de cultivo con Kanamicina. Los semilleros resistentes a la Kanamicina y las plantas del tabaco del tipo silvestre son transferidas a un caldo de cultivo MS complementado con  $10^{-3}$  M de Validamicina A. Como control, los semilleros transgénicos y las plantas de tipo silvestre son transferidas a un caldo de cultivo sin Validamicina A. El análisis de las hojas y raíces de las plantas crecidas en Validamicina A muestran niveles altos de trehalosa comparados con el de las plantas de control (Tabla 1). No se detectó trehalosa en las plantas del tabaco de tipo silvestre.

30

Tabla 1

	con Validamicina A		Sin Validamicina A	
	hojas	raíces	hojas	raíces
pMOG799.1	0,0081	0,0044	-	0,003
35 pMog799.13	0,0110	0,0080	-	-
pMOG799.31	0,0008	0,0088	-	-
Tipo silvestre SR1	-	-	-	-

40

## EJEMPLO 3

### Producción de trehalosa en los micro-tubérculos de la patata transformados con pMOG845



Los discos de los tubérculos de la patata *Solanum tuberosum* cv. Kardal son transformados con *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 albergando el sector binario pMOG845. Los brotes transgénicos son seleccionados en kanamicina. Los micro-tubérculos (m-tubérculos) son inducidos en los segmentos de los tallos de plantas transgénicas y del tipo silvestres cultivadas sobre m-tubérculos complementadas con un caldo inductor con  $10^{-3}$  M de Validamicina A. Como control, los m-tubérculos son inducidos a un caldo de cultivo sin Validamicina A. Los m-tubérculos inducidos en un caldo de cultivo sin Validamicina A mostraron niveles altos de trehalosa comparados con los de los m-tubérculos crecidos en un caldo de cultivo sin Validamicina A (Tabla 2). No se detectó trehalosa en los m-tubérculos de tipo silvestre.

Tabla 2

		Trehalosa (% peso fresco)	
		+Validamicina A	-Validamicina A
15	845-2	0,016	-
	845-4	-	-
	845-8	0,051	-
	845-13	0,005	-
20	845-22	0,121	-
	845-25	0,002	-
	wT Kardal	-	-

## EJEMPLO 4

25 Producción de trehalosa en hidrocultivos de las plantas del tabaco transformadas con pMOG799

Las semillas (S1) de plantas de tabaco polinizadas transformadas con el vector binario pMOG799 son esterilizadas en su superficie y germinadas in vitro en el caldo de cultivo MS20MS que contiene 50 µg/ml de kanamicina. Los semilleros resistentes a la kanamicina son transferidos a la tierra y crecidos en una cámara de crecimiento (temp. 23°C, 16 horas de luz/día). Después de cuatro semanas, los semilleros se transfieren a hidrocultivos con bolitas de arcilla ASEP con 450 ml aproximadamente de caldo de cultivo. El caldo contiene 40 g/l de Solacol disuelto en nano-agua compensada con 0,5 g/l de MES para ajustar el pH a 6,0 el cual es colado por un filtro para eliminar las partículas sólidas. Las sales esenciales se complementan añadiendo POKON™ (1,5 ml/l). Los siguientes antibióticos son añadidos para prevenir el crecimiento de micro-organismos: 500 µg/ml de Carbenicilina, 40 µg/ml de Nystatin y 100 µg/ml de Vancomicina. Como control, los semilleros transgénicos y las plantas de tipo silvestre son transferidas a un caldo de cultivo sin Solacol. El análisis de las hojas de las plantas crecidas en





Solacol muestra niveles altos de trehalosa en comparación con las de las plantas de control (Tabla 3). No se detectó trehalosa en las plantas del tabaco de tipo silvestre.

Tabla 3

	Solacol	Trehalosa (%w/w)
5		
pMOG 799.1-1	+	0,008
pMOG 799.1-2	+	0,004
pMOG 799.1-3	-	-
pMOG 799.1-4	-	-
10		
pMOG 799.1-5	+	0,008
pMOG 799.1-6	-	-
pMOG 799.1-7	+	0,005
pMOG 799.1-8	-	-
pMOG 799.1-9	-	-
15		
pMOG 799.1-10	+	0,007
Tipo silvestre SR1-1	-	-
Tipo silvestre SR1-2	+	-
Tipo silvestre SR1-3	-	-
20		
Tipo silvestre SR1-4	+	-

## EJEMPLO 5

Clonación de toda la longitud de CADN que codifica la trehalasa del tejido del tubérculo de la patata

25

Usando la secuencia de aminoácidos de las regiones conservadas de genes de la trehalasa conocidos (*E. Coli*, Levadura, Conejo, *B. mori*) (Figura 4), se diseñaron cuatro elementos degenerados:

30

C C C CGT GT A TTAT  
GG GGI G TT IGA T TA TGGGAC  
T A A IAA AG C CGGC

"Tase" 24 (NIS: 11)

TAA GT

35

GTICCI GGIGGICGITT IGA T  
CGT AG

"Tase" 25 (NIS: 12)

T GA TG A A  
GGIGG TGI ICGI LAG TA TA  
C CI CA G G

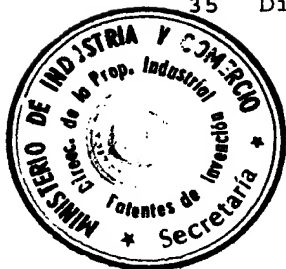
"Tase" 26 (NIS: 13)



C G AT A  
I C TTI CCATCC AAICCITC  
G A GC G

"Tase" 27 (NIS: 14)

- 5 La combinación de estos elementos en los experimentos de PCR con ADN genómico y cADN de la hoja del *S. tuberosum* cv. Kardal y material del tubérculo respectivamente como modelo, resultó en varios fragmentos de la longitud esperada. Un número de 100 bp. fragmentos obtenidos con la combinación del elemento Tase 24 y Tase 26 fueron subclonados en un vector
- 10 pGEM T y secuenciados. Varios de los clones analizados mostraron similitud con las secuencias de trehalasa conocidas. Para excluir el aislamiento de las secuencias de la trehalasa derivadas de no-plantas, fue llevado a cabo el análisis del Sur de mancha con el gADN de la patata cv. Kardal. Un número de clones aislados no se hibridizaron con el ADN genómico Kardal y fueron
- 15 rechazados. Dos genes aislados fueron idénticos, gTase15.4 derivado de un experimento PCR genómico y cTase5.2 derivado de un PCR sobre cADN, los dos mostraban hibridación en el análisis del Sur de mancha. Se detectó una sola banda hibridora (AcoRI 1,5 Kb, HindIII 3 Kb y BamHI mayor que 12 Kb) sugiriendo la presencia de solamente una copia del fragmento PCR aislado.
- 20 Un cADN fue construido sobre ARN poli A' de los tubérculos de la patata (cv. Kardal) usando un conjunto de síntesis de cADN Stratagen y el vector Lambda ZAPII. Fagos recombinantes (500.000) fueron tapados con el fragmento PCR del radio-marcador cTase5.2 dando como resultado la identificación de 3 clones positivos. Después de la purificación, dos clones fueron caracterizados con
- 25 enzimas de restricción mostrando añadidos de 2,15 y 2,3 kb respectivamente. Su secuencia de nucleótidos era idéntica al 100%. La secuencia del ácido nucléico de uno de estos clones de cADN de trehalasa de *Solarum tuberosum* que incluye su marco de lectura abierta está representado con el número de identificación de secuencia: 9, mientras que la secuencia del aminoácido
- 30 derivada de su secuencia de ácido nucléico se muestra con el número de identificación de secuencia: 10. Un plásmido albergando un añadido que incluye la información genética que codifica para la trehalasa, se ha depositado bajo el número CBS 804.95 con el Central Bureau voor Schimmelcultures, Oosterstraat 1, P.O. Box 273, 3740 AG Baarn, Holanda el 8. de
- 35 Diciembre de 1995.



## LISTADO DE LAS SECUENCIAS

## (1) INFORMACION GENERAL:

## (i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: MOGEN International n.v.
- (B) CALLE: Einsteinweg 97
- (C) CIUDAD: LEIDEN
- (D) ESTADO: Zuid-Holland
- (E) PAIS: The Netherlands
- (F) CODIGO POSTAL (ZIP): NL-2333 CB
- (G) TELEFONO: (31).(71).5258282
- (H) TELEFAX: (31).(71).5221471

(ii) TITULO DE LA INVENCION: PRODUCCION DE TREHALOSA EN PLANTAS

(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 14

## (iv) FORMA DE LECTURA DEL ORDENADOR:

- (A) TIPO MEDIO: Diskette
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25 (EPO)

## (vi) PRIOR APPLICATION DATA

- (A) APPLICATION NUMBER: EP 95.200.008.1
- (B) FILING DATE: 04-JAN-1995

## (vi) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: EP 95.202.415.6
- (B) FILING DATE: 07-SEP-1995

## (2) INFORMACION PARA EL NUMERO DE IDENTIFICACION DE SECUENCIA NO: 1

## (i) INFORMACION PARA EL NUMERO DE IDENTIFICACION DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1446 base pairs
- (B) TIPO:ácido nucléico
- (C) TIPO DE FIBRAS: doble
- (D) TOPOLOGICA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

## (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Escherichia coli
- (B) CLON: 7F11

(viii) POSICION EN EL GENOMA:

- (B) POSICION DEL MAPA: 41-42'



## (ix) CARACTERISTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS  
 (B) SITUACION: 19..1446  
 (D) OTRA INFORMACION: /producto= "sintasa de fosfato de trehalosa"  
 /gen= "otsA"

## (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 1:

GAGAAAATAA	CAGGAGTG	ATG	ACT	ATG	AGT	CGT	TTA	GTC	GTA	GTA	TCT	AAC	51			
		Met	Thr	Met	Ser	Arg	Leu	Val	Val	Val	Ser	Asn				
		1				5					10					
CGG	ATT	GCA	CCA	CCA	GAC	GAG	CAC	GCC	GCC	AGT	GCC	GGT	GGC	CTT	GCC	99
Arg	Ile	Ala	Pro	Pro	Asp	Glu	His	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly	Leu	Ala	
		15					20					25				
GTT	GGC	ATA	CTG	GGG	GCA	CTG	AAA	GCC	GCA	GGC	GGA	CTG	TGG	TTT	GGC	147
Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Trp	Phe	Gly	
		30					35					40				
TGG	AGT	GGT	GAA	ACA	GGG	AAT	GAG	GAT	CAG	CCG	CTA	AAA	AAG	GTG	AAA	195
Trp	Ser	Gly	Glu	Thr	Gly	Asn	Glu	Asp	Gln	Pro	Leu	Lys	Lys	Val	Lys	
	45					50					55					
AAA	GGT	AAC	ATT	ACG	TGG	GCC	TCT	TTT	AAC	CTC	AGC	GAA	CAG	GAC	CTT	243
Lys	Gly	Asn	Ile	Thr	Trp	Ala	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Glu	Gln	Asp	Leu	
	60					65				70					75	
GAC	GAA	TAC	TAC	AAC	CAA	TTC	TCC	AAT	GCC	GTT	CTC	TGG	CCC	GCT	TTT	291
Asp	Glu	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Phe	Ser	Asn	Ala	Val	Leu	Trp	Pro	Ala	Phe	
				80					85					90		
CAT	TAT	CGG	CTC	GAT	CTG	GTG	CAA	TTT	CAG	CGT	CCT	GCC	TGG	GAC	GGC	339
His	Tyr	Arg	Leu	Asp	Leu	Val	Gln	Phe	Gln	Arg	Pro	Ala	Trp	Asp	Gly	
			95					100					105			
TAT	CTA	CGC	GTA	AAT	GCG	TTG	CTG	GCA	GAT	AAA	TTA	CTG	CCG	CTG	TTG	387
Tyr	Leu	Arg	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Lys	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	
	110						115					120				
CAA	GAC	GAT	GAC	ATT	ATC	TGG	ATC	CAC	GAT	TAT	CAC	CTG	TTG	CCA	TTT	435
Gln	Asp	Asp	Asp	Ile	Ile	Trp	Ile	His	Asp	Tyr	His	Leu	Leu	Pro	Phe	
	125					130				135						
GCG	CAT	GAA	TTA	CGC	AAA	CGG	GGA	GTG	AAT	AAT	CGC	ATT	GGT	TTC	TTT	483
Ala	His	Glu	Leu	Arg	Lys	Arg	Gly	Val	Asn	Asn	Arg	Ile	Gly	Phe	Phe	
	140				145				150						155	
CTG	CAT	ATT	CCT	TTC	CCG	ACA	CCG	GAA	ATC	TTC	AAC	GCG	CTG	CCG	ACA	531
Leu	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Thr	Pro	Glu	Ile	Phe	Asn	Ala	Leu	Pro	Thr	
				160				165					170			



TAT	GAC	ACC	TTG	CTT	GAA	CAG	CTT	TGT	GAT	TAT	GAT	TTG	CTG	GGT	TTC	579
Tyr	Asp	Thr	Leu	Leu	Glu	Gln	Leu	Cys	Asp	Tyr	Asp	Leu	Leu	Gly	Phe	
			175					180						185		
CAG	ACA	GAA	AAC	GAT	CGT	CTG	GCG	TTC	CTG	GAT	TGT	CTT	TCT	AAC	CTG	627
Gln	Thr	Glu	Asn	Asp	Arg	Leu	Ala	Phe	Leu	Asp	Cys	Leu	Ser	Asn	Leu	
			190					195						200		
ACC	CGC	GTC	ACG	ACA	CGT	AGC	GCA	AAA	AGC	CAT	ACA	GCC	TGG	GGC	AAA	675
Thr	Arg	Val	Thr	Thr	Arg	Ser	Ala	Lys	Ser	His	Thr	Ala	Trp	Gly	Lys	
			205					210						215		
GCA	TTT	CGA	ACA	GAA	GTC	TAC	CCG	ATC	GGC	ATT	GAA	CCG	AAA	GAA	ATA	723
Ala	Phe	Arg	Thr	Glu	Val	Tyr	Pro	Ile	Gly	Ile	Glu	Pro	Lys	Glu	Ile	
220						225					230				235	
GCC	AAA	CAG	GCT	GCC	GGG	CCA	CTG	CCG	CCA	AAA	CTG	GCG	CAA	CTT	AAA	771
Ala	Lys	Gln	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Pro	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Lys	
					240					245					250	
GCG	GAA	CTG	AAA	AAC	GTA	CAA	AAT	ATC	TTT	TCT	GTC	GAA	CGG	CTG	GAT	819
Ala	Glu	Leu	Lys	Asn	Val	Gln	Asn	Ile	Phe	Ser	Val	Glu	Arg	Leu	Asp	
			255					260						265		
TAT	TCC	AAA	GGT	TTG	CCA	GAG	CGT	TTT	CTC	GCC	TAT	GAA	GCG	TTG	CTG	867
Tyr	Ser	Lys	Gly	Leu	Pro	Glu	Arg	Phe	Leu	Ala	Tyr	Glu	Ala	Leu	Leu	
			270					275						280		
GAA	AAA	TAT	CCG	CAG	CAT	CAT	GGT	AAA	ATT	CGT	TAT	ACC	CAG	ATT	GCA	915
Glu	Lys	Tyr	Pro	Gln	His	His	Gly	Lys	Ile	Arg	Tyr	Thr	Gln	Ile	Ala	
			285					290						295		
CCA	ACG	TCG	CGT	GGT	GAT	GTG	CAA	GCC	TAT	CAG	GAT	ATT	CGT	CAT	CAG	963
Pro	Thr	Ser	Arg	Gly	Asp	Val	Gln	Ala	Tyr	Gln	Asp	Ile	Arg	His	Gln	
300						305					310				315	
CTC	GAA	AAT	GAA	GCT	GGA	CGA	ATT	AAT	GGT	AAA	TAC	GGG	CAA	TTA	GGC	1011
Leu	Glu	Asn	Glu	Ala	Gly	Arg	Ile	Asn	Gly	Lys	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gly	
					320					325					330	
TGG	ACG	CCG	CTT	TAT	TAT	TTG	AAT	CAG	CAT	TTT	GAC	CGT	AAA	TTA	CTG	1059
Trp	Thr	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Gln	His	Phe	Asp	Arg	Lys	Leu	Leu	
			335					340						345		
ATG	AAA	ATA	TTC	CGC	TAC	TCT	GAC	GTG	GGC	TTA	GTG	ACG	CCA	CTG	CGT	1107
Met	Lys	Ile	Phe	Arg	Tyr	Ser	Asp	Val	Gly	Leu	Val	Thr	Pro	Leu	Arg	
			350					355						360		
GAC	GGG	ATG	AAC	CTG	GTA	GCA	AAA	GAG	TAT	GTT	GCT	GCT	CAG	GAC	CCA	1155
Asp	Gly	Met	Asn	Leu	Val	Ala	Lys	Glu	Tyr	Val	Ala	Ala	Gln	Asp	Pro	
			365					370						375		
GCC	AAT	CCG	GGC	GTT	CTT	GTT	CTT	TCG	CAA	TTT	GCG	GGA	GCG	GCA	AAC	1203
Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Ala	Ala	Asn	
380						385					390				395	



GAG TTA ACG TCG GCG TTA ATT GTT AAC CCC TAC GAT CGT GAC GAA GTT 1251  
 Glu Leu Thr Ser Ala Leu Ile Val Asn Pro Tyr Asp Arg Asp Glu Val  
 400 405 410  
  
 GCA GCT GCG CTG GAT CGT GCA TTG ACT ATG TCG CTG GCG GAA CGT ATT 1299  
 Ala Ala Ala Leu Asp Arg Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala Glu Arg Ile  
 415 420 425  
  
 TCC CGT CAT GCA GAA ATG CTG GAC GTT ATC GTG AAA AAC GAT ATT AAC 1347  
 Ser Arg His Ala Glu Met Leu Asp Val Ile Val Lys Asn Asp Ile Asn  
 430 435 440  
  
 CAC TGG CAG GAG TGC TTC ATT AGC GAC CTA AAG CAG ATA GTT CCG CGA 1395  
 His Trp Gln Glu Cys Phe Ile Ser Asp Leu Lys Gln Ile Val Pro Arg  
 445 450 455  
  
 AGC GCG GAA AGC CAG CAG CGC GAT AAA GTT GCT ACC TTT CCA AAG CTT 1443  
 Ser Ala Glu Ser Gln Gln Arg Asp Lys Val Ala Thr Phe Pro Lys Leu  
 460 465 470 475  
  
 GCG 1446  
 Ala

## (2) INFORMACION PARA EL NIS: 2:

## (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA :

(A) LONGITUD: 476 aminoácidos

(B) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 2:

Met Thr Met Ser Arg Leu Val Val Val Ser Asn Arg Ile Ala Pro Pro  
 1 5 10 15  
  
 Asp Glu His Ala Ala Ser Ala Gly Gly Leu Ala Val Gly Ile Leu Gly  
 20 25 30  
  
 Ala Leu Lys Ala Ala Gly Gly Leu Trp Phe Gly Trp Ser Gly Glu Thr  
 35 40 45  
  
 Gly Asn Glu Asp Gln Pro Leu Lys Lys Val Lys Lys Gly Asn Ile Thr  
 50 55 60  
  
 Trp Ala Ser Phe Asn Leu Ser Glu Gln Asp Leu Asp Glu Tyr Tyr Asn  
 65 70 75 80  
  
 Gln Phe Ser Asn Ala Val Leu Trp Pro Ala Phe His Tyr Arg Leu Asp  
 85 90 95  
  
 Leu Val Gln Phe Gln Arg Pro Ala Trp Asp Gly Tyr Leu Arg Val Asn  
 100 105 110

Ala Leu Leu Ala Asp Lys Leu Leu Pro Leu Leu Gln Asp Asp Asp Ile  
115 120 125

Ile Trp Ile His Asp Tyr His Leu Leu Pro Phe Ala His Glu Leu Arg  
130 135 140

Lys Arg Gly Val Asn Asn Arg Ile Gly Phe Phe Leu His Ile Pro Phe  
145 150 155 160

Pro Thr Pro Glu Ile Phe Asn Ala Leu Pro Thr Tyr Asp Thr Leu Leu  
165 170 175

Glu Gln Leu Cys Asp Tyr Asp Leu Leu Gly Phe Gln Thr Glu Asn Asp  
180 185 190

Arg Leu Ala Phe Leu Asp Cys Leu Ser Asn Leu Thr Arg Val Thr Thr  
195 200 205

Arg Ser Ala Lys Ser His Thr Ala Trp Gly Lys Ala Phe Arg Thr Glu  
210 215 220

Val Tyr Pro Ile Gly Ile Glu Pro Lys Glu Ile Ala Lys Gln Ala Ala  
225 230 235 240

Gly Pro Leu Pro Pro Lys Leu Ala Gln Leu Lys Ala Glu Leu Lys Asn  
245 250 255

Val Gln Asn Ile Phe Ser Val Glu Arg Leu Asp Tyr Ser Lys Gly Leu  
260 265 270

Pro Glu Arg Phe Leu Ala Tyr Glu Ala Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Gln  
275 280 285

His His Gly Lys Ile Arg Tyr Thr Gln Ile Ala Pro Thr Ser Arg Gly  
290 295 300

Asp Val Gln Ala Tyr Gln Asp Ile Arg His Gln Leu Glu Asn Glu Ala  
305 310 315 320

Gly Arg Ile Asn Gly Lys Tyr Gly Gln Leu Gly Trp Thr Pro Leu Tyr  
325 330 335

Tyr Leu Asn Gln His Phe Asp Arg Lys Leu Leu Met Lys Ile Phe Arg  
340 345 350

Tyr Ser Asp Val Gly Leu Val Thr Pro Leu Arg Asp Gly Met Asn Leu  
355 360 365

Val Ala Lys Glu Tyr Val Ala Ala Gln Asp Pro Ala Asn Pro Gly Val  
370 375 380

Leu Val Leu Ser Gln Phe Ala Gly Ala Ala Asn Glu Leu Thr Ser Ala  
385 390 395 400



Leu	Ile	Val	Asn	Pro	Tyr	Asp	Arg	Asp	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Leu	Asp	
				405					410					415		
Arg	Ala	Leu	Thr	Met	Ser	Leu	Ala	Glu	Arg	Ile	Ser	Arg	His	Ala	Glu	
				420					425					430		
Met	Leu	Asp	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Asp	Ile	Asn	His	Trp	Gln	Glu	Cys	
				435					440					445		
Phe	Ile	Ser	Asp	Leu	Lys	Gln	Ile	Val	Pro	Arg	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln	
				450					455					460		
Gln	Arg	Asp	Lys	Val	Ala	Thr	Phe	Pro	Lys	Leu	Ala					
				465					470					475		

(2) INFORMACION PARA EL NIS: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 25 pares de base
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIP DE FIBRAS: sencillo
  - (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

( i i i )

HIPOJETICO: SI

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA EL NIS: 3:

AAGCTTATGT TGCCATATAG AGTAG

25

(2) INFORMACION PARA EL NIS: 4:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 24 pares de base
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
  - (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(iii) ANTI-SENSE: NO

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 4:

GTAGTTGCCA TGGTGCAAAT GTTC

24

(2) INFORMACION PARA EL NIS: 5:





## (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares base
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 5:

AGCTCTGCAG TGAGGTACCA

20

## (2) INFORMACION PARA EL NIS: 6:

## (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS:

GACGTCCTC CATGGTTCGA

20

## (2) INFORMACION PARA EL NIS: 7:

## (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 7:

GTACCCTGCA GTGTGACCCT AGAC

24

## (2) INFORMACION PARA EL NIS: 8:

## (I) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucléico



21

CTTTTCTGAG	TAATAACATA	GGCATTGATT	TTTTTTCAAT	TAATAACACC	TGCAAACATT	60										
CCCATTGCCG	GCATTCTCTG	TTCTTACAAA	AAAAAACATT	TTTTTGTTCA	CATAAATTAG	120										
TTATGGCATC	AGTATTGAAC	CCTTTAACTT	GTTATACAAT	ATG	GGT	AAA	GCT	ATA	175							
				Met	Gly	Lys	Ala	Ile								
				1				5								
ATT	TTT	ATG	ATT	TTT	ACT	ATG	TCT	ATG	AAT	ATG	ATT	AAA	GCT	GAA	ACT	223
Ile	Phe	Met	Ile	Phe	Thr	Met	Ser	Met	Asn	Met	Ile	Lys	Ala	Glu	Thr	
				10					15					20		

TGC	AAA	TCC	ATT	GAT	AAG	GGT	CCT	GTA	ATC	CCA	ACA	ACC	CCT	TTA	GTG	271
Cys	Lys	Ser	Ile	Asp	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Pro	Thr	Thr	Pro	Leu	Val	
			25					30					35			
ATT	TTT	CTT	GAA	AAA	GTT	CAA	GAA	GCT	GCT	CTT	CAA	ACT	TAT	GGC	CAT	319
Ile	Phe	Leu	Glu	Lys	Val	Gln	Glu	Ala	Ala	Leu	Gln	Thr	Tyr	Gly	His	
		40					45					50				
AAA	GGG	TTT	GAT	GCT	AAA	CTG	TTT	GTT	GAT	ATG	TCA	CTG	AGA	GAG	AGT	367
Lys	Gly	Phe	Asp	Ala	Lys	Leu	Phe	Val	Asp	Met	Ser	Leu	Arg	Glu	Ser	
	55					60					65					
CTT	TCA	GAA	ACA	GTT	GAA	GCT	TTT	AAT	AAG	CTT	CCA	AGA	GTT	GTG	AAT	415
Leu	Ser	Glu	Thr	Val	Glu	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Pro	Arg	Val	Val	Asn	
70					75					80					85	
GGT	TCA	ATA	TCA	AAA	AGT	GAT	TTG	GAT	GGT	TTT	ATA	GGT	AGT	TAC	TTG	463
Gly	Ser	Ile	Ser	Lys	Ser	Asp	Leu	Asp	Gly	Phe	Ile	Gly	Ser	Tyr	Leu	
				90					95					100		
AGT	AGT	CCT	GAT	AAG	GAT	TTG	GTT	TAT	GTT	GAG	CCT	ATG	GAT	TTT	GTG	511
Ser	Ser	Pro	Asp	Lys	Asp	Leu	Val	Tyr	Val	Glu	Pro	Met	Asp	Phe	Val	
			105					110					115			
GCT	GAG	CCT	GAA	GGC	TTT	TTG	CCA	AAG	GTG	AAG	AAT	TCT	GAG	GTG	AGG	559
Ala	Glu	Pro	Glu	Gly	Phe	Leu	Pro	Lys	Val	Lys	Asn	Ser	Glu	Val	Arg	
		120					125					130				
GCA	TGG	GCA	TTG	GAG	GTG	CAT	TCA	CTT	TGG	AAG	AAT	TTA	AGT	AGG	AAA	607
Ala	Trp	Ala	Leu	Glu	Val	His	Ser	Leu	Trp	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Lys	
	135					140					145					
GTG	GCT	GAT	CAT	GTA	TTG	GAA	AAA	CCA	GAG	TTG	TAT	ACT	TTG	CTT	CCA	655
Val	Ala	Asp	His	Val	Leu	Glu	Lys	Pro	Glu	Leu	Tyr	Thr	Leu	Leu	Pro	
150					155					160					165	
TTG	AAA	AAT	CCA	GTT	ATT	ATA	CCG	GGA	TCG	CGT	TTT	AAG	GAG	GTT	TAT	703
Leu	Lys	Asn	Pro	Val	Ile	Ile	Pro	Gly	Ser	Arg	Phe	Lys	Glu	Val	Tyr	
				170					175					180		
TAT	TGG	GAT	TCT	TAT	TGG	GTA	ATA	AGG	GGT	TTG	TTA	GCA	AGC	AAA	ATG	751
Tyr	Trp	Asp	Ser	Tyr	Trp	Val	Ile	Arg	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Lys	Met	
			185					190					195			
TAT	GAA	ACT	GCA	AAA	GGG	ATT	GTG	ACT	AAT	CTG	GTT	TCT	CTG	ATA	GAT	799
Tyr	Glu	Thr	Ala	Lys	Gly	Ile	Val	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Leu	Ile	Asp	
		200					205					210				
AAA	TTT	GGT	TAT	GTT	CTT	AAC	GGT	GCA	AGA	GCA	TAC	TAC	AGT	AAC	AGA	847
	Phe	Gly	Tyr	Val	Leu	Asn	Gly	Ala	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Arg	
	215					220					225					



AGT	CAG	CCT	CCT	GTC	CTG	GCC	ACG	ATG	ATT	GTT	GAC	ATA	TTC	AAT	CAG	895
Ser	Gln	Pro	Pro	Val	Leu	Ala	Thr	Met	Ile	Val	Asp	Ile	Phe	Asn	Gln	
230					235					240					245	
ACA	GGT	GAT	TTA	AAT	TTG	GTT	AGA	AGA	TCC	CTT	CCT	GCT	TTG	CTC	AAG	943
Thr	Gly	Asp	Leu	Asn	Leu	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Leu	Leu	Lys	
				250					255					260		
GAG	AAT	CAT	TTT	TGG	AAT	TCA	GGA	ATA	CAT	AAG	GTG	ACT	ATT	CAA	GAT	991
Glu	Asn	His	Phe	Trp	Asn	Ser	Gly	Ile	His	Lys	Val	Thr	Ile	Gln	Asp	
			265					270					275			
GCT	CAG	GGA	TCA	AAC	CAC	AGC	TTG	AGT	CGG	TAC	TAT	GCT	ATG	TGG	AAT	1039
Ala	Gln	Gly	Ser	Asn	His	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Met	Trp	Asn	
		280					285					290				
AAG	CCC	CGT	CCA	GAA	TCG	TCA	ACT	ATA	GAC	AGT	GAA	ACA	GCT	TCC	GTA	1087
Lys	Pro	Arg	Pro	Glu	Ser	Ser	Thr	Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Ser	Val	
	295					300					305					
CTC	CCA	AAT	ATA	TGT	GAA	AAA	AGA	GAA	TTA	TAC	CGT	GAA	CTG	GCA	TCA	1135
Leu	Pro	Asn	Ile	Cys	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Tyr	Arg	Glu	Leu	Ala	Ser	
310					315					320					325	
GCT	GCT	GAA	AGT	GGA	TGG	GAT	TTC	AGT	TCA	AGA	TGG	ATG	AGC	AAC	GGA	1183
Ala	Ala	Glu	Ser	Gly	Trp	Asp	Phe	Ser	Ser	Arg	Trp	Met	Ser	Asn	Gly	
				330				335						340		
TCT	GAT	CTG	ACA	ACA	ACT	AGT	ACA	ACA	TCA	ATT	CTA	CCA	GTT	GAT	TTG	1231
Ser	Asp	Leu	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ile	Leu	Pro	Val	Asp	Leu	
			345					350					355			
AAT	GCA	TTC	CTT	CTG	AAG	ATG	GAA	CTT	GAC	ATT	GCC	TTT	CTA	GCA	AAT	1279
Asn	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Met	Glu	Leu	Asp	Ile	Ala	Phe	Leu	Ala	Asn	
		360					365					370				
CTT	GTT	GGA	GAA	AGT	AGC	ACG	GCT	TCA	CAT	TTT	ACA	GAA	GCT	GCT	CAA	1327
Leu	Val	Gly	Glu	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	His	Phe	Thr	Glu	Ala	Ala	Gln	
	375					380					385					
AAT	AGA	CAG	AAG	GCT	ATA	AAC	TGT	ATC	TTT	TGG	AAC	GCA	GAG	ATG	GGG	1375
Asn	Arg	Gln	Lys	Ala	Ile	Asn	Cys	Ile	Phe	Trp	Asn	Ala	Glu	Met	Gly	
390					395					400				405		
CAA	TGG	CTT	GAT	TAC	TGG	CTT	ACC	AAC	AGC	GAC	ACA	TCT	GAG	GAT	ATT	1423
Gln	Trp	Leu	Asp	Tyr	Trp	Leu	Thr	Asn	Ser	Asp	Thr	Ser	Glu	Asp	Ile	
				410					415					420		
TAT	AAA	TGG	GAA	GAT	TTG	CAC	CAG	AAC	AAG	AAG	TCA	TTT	GCC	TCT	AAT	1471
Gly	Lys	Trp	Glu	Asp	Leu	His	Gln	Asn	Lys	Lys	Ser	Phe	Ala	Ser	Asn	
			425					430					435			
GTT	CCG	CTG	TGG	ACT	GAA	ATT	TCT	TGT	TCA	GAT	AAT	AAT	ATC	ACA		1519
Val	Pro	Leu	Trp	Thr	Glu	Ile	Ser	Cys	Ser	Asp	Asn	Asn	Ile	Thr		
		440				445						450				



ACT CAG AAA GTA GTT CAA AGT CTC ATG AGC TCG GGC TTG CTT CAG CCT 1567  
 Thr Gln Lys Val Val Gln Ser Leu Met Ser Ser Gly Leu Leu Gln Pro  
 455 460 465

GCA GGG ATT GCA ATG ACC TTG TCT AAT ACT GGA CAG CAA TGG GAT TTT 1615  
 Ala Gly Ile Ala Met Thr Leu Ser Asn Thr Gly Gln Gln Trp Asp Phe  
 470 475 480 485

CCG AAT GGT TGG CCC CCC CTT CAA CAC ATA ATC ATT GAA GGT CTC TTA 1663  
 Pro Asn Gly Trp Pro Pro Leu Gln His Ile Ile Ile Glu Gly Leu Leu  
 490 495 500

AGG TCT GGA CTA GAA GAG GCA AGA ACC TTA GCA AAA GAC ATT GCT ATT 1711  
 Arg Ser Gly Leu Glu Glu Ala Arg Thr Leu Ala Lys Asp Ile Ala Ile  
 505 510 515

CGC TGG TTA AGA ACT AAC TAT GTG ACT TAC AAG AAA ACC GGT GCT ATG 1759  
 Arg Trp Leu Arg Thr Asn Tyr Val Thr Tyr Lys Lys Thr Gly Ala Met  
 520 525 530

TAT GAA AAA TAT GAT GTC ACA AAA TGT GGA GCA TAT GGA GGT GGT GGT 1807  
 Tyr Glu Lys Tyr Asp Val Thr Lys Cys Gly Ala Tyr Gly Gly Gly Gly  
 535 540 545

GAA TAT ATG TCC CAA ACG GGT TTC GGA TGG TCA AAT GGC GTT GTA CTG 1855  
 Glu Tyr Met Ser Gln Thr Gly Phe Gly Trp Ser Asn Gly Val Val Leu  
 550 555 560 565

GCA CTT CTA GAG GAA TTT GGA TGG CCT GAA GAT TTG AAG ATT GAT TGC 1903  
 Ala Leu Leu Glu Glu Phe Gly Trp Pro Glu Asp Leu Lys Ile Asp Cys  
 570 575 580

TAATGAGCAA GTAGAAAAGC CAAATGAAAC ATCATTGAGT TTTATTTTCT TCTTTTGTTA 1963

AAATAAGCTG CAATGGTTTG CTGATAGTTT ATGTTTTGTA TTACTATTTC ATAAGGTTTT 2023

TGTACCATAT CAAGTGATAT TACCATGAAC TATGTCGTTT GGACTCTTCA AATCGGATTT 2083

TGCAAAAATA ATGCAGTTTT GGAGAATCCG ATAACATAGA CCATGTATGG ATCTAAATTG 2143

TAAACAGCTT ACTATATTAA GTAAAAGAAA GATGATTCCT CTGCTTTAAA AAAAAAAAAA 2203

AAAA 2207

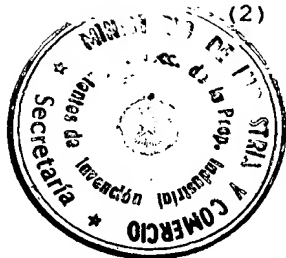
## (2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA NIS: 10:

## (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 581 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: lineal

## (ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

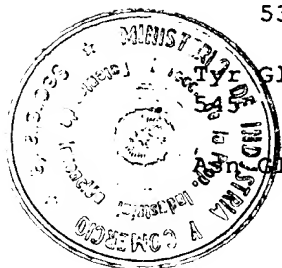
## (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 10:



Met Gly Lys Ala Ile Ile Phe Met Ile Phe Thr Met Ser Met Asn Met  
 1 5 10 15  
 Ile Lys Ala Glu Thr Cys Lys Ser Ile Asp Lys Gly Pro Val Ile Pro  
 20 25 30  
 Thr Thr Pro Leu Val Ile Phe Leu Glu Lys Val Gln Glu Ala Ala Leu  
 35 40 45  
 Gln Thr Tyr Gly His Lys Gly Phe Asp Ala Lys Leu Phe Val Asp Met  
 50 55 60  
 Ser Leu Arg Glu Ser Leu Ser Glu Thr Val Glu Ala Phe Asn Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Val Val Asn Gly Ser Ile Ser Lys Ser Asp Leu Asp Gly Phe  
 85 90 95  
 Ile Gly Ser Tyr Leu Ser Ser Pro Asp Lys Asp Leu Val Tyr Val Glu  
 100 105 110  
 Pro Met Asp Phe Val Ala Glu Pro Glu Gly Phe Leu Pro Lys Val Lys  
 115 120 125  
 Asn Ser Glu Val Arg Ala Trp Ala Leu Glu Val His Ser Leu Trp Lys  
 130 135 140  
 Asn Leu Ser Arg Lys Val Ala Asp His Val Leu Glu Lys Pro Glu Leu  
 145 150 155 160  
 Tyr Thr Leu Leu Pro Leu Lys Asn Pro Val Ile Ile Pro Gly Ser Arg  
 165 170 175  
 Phe Lys Glu Val Tyr Tyr Trp Asp Ser Tyr Trp Val Ile Arg Gly Leu  
 180 185 190  
 Leu Ala Ser Lys Met Tyr Glu Thr Ala Lys Gly Ile Val Thr Asn Leu  
 195 200 205  
 Val Ser Leu Ile Asp Gln Phe Gly Tyr Val Leu Asn Gly Ala Arg Ala  
 210 215 220  
 Tyr Tyr Ser Asn Arg Ser Gln Pro Pro Val Leu Ala Thr Met Ile Val  
 225 230 235 240  
 Asp Ile Phe Asn Gln Thr Gly Asp Leu Asn Leu Val Arg Arg Ser Leu  
 245 250 255  
 Pro Ala Leu Leu Lys Glu Asn His Phe Trp Asn Ser Gly Ile His Lys  
 260 265 270  
 Thr Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Asn His Ser Leu Ser Arg Tyr  
 275 280 285



Tyr Ala Met Trp Asn Lys Pro Arg Pro Glu Ser Ser Thr Ile Asp Ser  
 290 295 300  
 Glu Thr Ala Ser Val Leu Pro Asn Ile Cys Glu Lys Arg Glu Leu Tyr  
 305 310 315 320  
 Arg Glu Leu Ala Ser Ala Ala Glu Ser Gly Trp Asp Phe Ser Ser Arg  
 325 330 335  
 Trp Met Ser Asn Gly Ser Asp Leu Thr Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ile  
 340 345 350  
 Leu Pro Val Asp Leu Asn Ala Phe Leu Leu Lys Met Glu Leu Asp Ile  
 355 360 365  
 Ala Phe Leu Ala Asn Leu Val Gly Glu Ser Ser Thr Ala Ser His Phe  
 370 375 380  
 Thr Glu Ala Ala Gln Asn Arg Gln Lys Ala Ile Asn Cys Ile Phe Trp  
 385 390 395 400  
 Asn Ala Glu Met Gly Gln Trp Leu Asp Tyr Trp Leu Thr Asn Ser Asp  
 405 410 415  
 Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Lys Trp Glu Asp Leu His Gln Asn Lys Lys  
 420 425 430  
 Ser Phe Ala Ser Asn Phe Val Pro Leu Trp Thr Glu Ile Ser Cys Ser  
 435 440 445  
 Asp Asn Asn Ile Thr Thr Gln Lys Val Val Gln Ser Leu Met Ser Ser  
 450 455 460  
 Gly Leu Leu Gln Pro Ala Gly Ile Ala Met Thr Leu Ser Asn Thr Gly  
 465 470 475 480  
 Gln Gln Trp Asp Phe Pro Asn Gly Trp Pro Pro Leu Gln His Ile Ile  
 485 490 495  
 Ile Glu Gly Leu Leu Arg Ser Gly Leu Glu Glu Ala Arg Thr Leu Ala  
 500 505 510  
 Lys Asp Ile Ala Ile Arg Trp Leu Arg Thr Asn Tyr Val Thr Tyr Lys  
 515 520 525  
 Lys Thr Gly Ala Met Tyr Glu Lys Tyr Asp Val Thr Lys Cys Gly Ala  
 530 535 540  
 Tyr Gly Gly Gly Gly Glu Tyr Met Ser Gln Thr Gly Phe Gly Trp Ser  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Val Val Leu Ala Leu Leu Glu Glu Phe Gly Trp Pro Glu Asp  
 565 570 575



Leu Lys Ile Asp Cys  
580

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 6
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 15
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA NIS: 11:

GGYGGNMGMT TYRWNGARKT MTAYKRYTGG GAC

33

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA: NIS: 12:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 pares de base
- (B) TIPO: ácido nucléico
- (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 3
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 6
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i





- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 9
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 12
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 15
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 21
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA NIS: 12:

GTNCCNGGNG GNCGNTTYRW NGARKT

26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA: NIS: 13:

- (i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 26 pares de base
  - (B) TIPO: ácido nucléico
  - (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
  - (D) TOPOLOGIA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)
- (iii) HIPOTETICO: SI
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 3
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 9
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 12
  - (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i
- (ix) CARACTERISTICA:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
  - (B) SITUACION: 15



(D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 18
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 13:

GGNGGYTGNS WNCGNRYRNAG RTARTA

26

(2) INFORMACION PARA LA SECUENCIA NIS: 14:

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de base
- (B) TIPO: nucleic acid
- (C) TIPO DE FIBRAS: sencillo
- (D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN (genómica)

(iii) HIPOTETICO: SI

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 1
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 7
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 19
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(ix) CARACTERISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: modified\_base
- (B) SITUACION: 22
- (D) OTRA INFORMACION: /mod\_base= i

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: NIS: 14:

MSCRTTNRVC CATCCRAANC CNTC

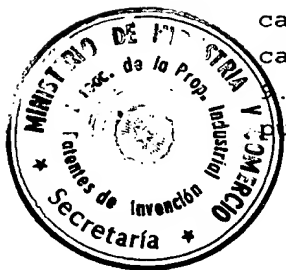
24



REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir trehalosa en las células de las plantas capaces de producir trehalasa por el crecimiento de las células de las plantas teniendo la información genética necesaria para la producción de trehalosa y  
5 trehalasa, o cultivando una planta o parte de la misma que incluya dichas células vegetales, caracterizado porque dichas células de la planta son cultivadas, o dicha planta o parte de la planta, es cultivada en la presencia de un inhibidor de la trehalasa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichas  
10 células de la planta han sido alteradas genéticamente para que así contengan un gen de sintasa de fosfato de trehalosa quimérico en forma expresible de la planta, preferiblemente caracterizado porque el gen de sintasa de fosfato de trehalosa incluye un marco de lectura abierta que codifica la sintasa de fosfato de trehalosa de la *E. Coli* en una forma expresible de la planta, mas  
15 preferentemente caracterizado porque el marco de lectura abierta que codifica la sintasa de fosfato de trehalosa de la *E. Coli* es bajada del activador CaMV 35S ARN del activador del patatin de la patata.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque se cultiva la planta de *Solanum tuberosum*, preferentemente caracterizado porque  
20 dicha planta tiene micro-tubérculos.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque dicha planta se cultiva *in vitro*.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque el mencionado inhibidor de la trehalasa incluye la validamicina A en una forma adecuada para la absorción por dichas células de  
25 la planta, dicha planta, o una parte de la misma, preferentemente caracterizado porque la concentración de validamicina A está entre 100 nM y 10 nm, mas preferentemente entre 0,1 y 1 nm, en solución acuosa.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque dicho inhibidor de la trehalasa incluye la proteína 86kD de la cucaracha (*Periplaneta americana*) en una forma adecuada para la absorción por dichas células de la planta, dicha planta, o una parte de la misma.  
30
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque dichas células de la planta han sido alteradas genéticamente para contener la información genética para un inhibidor de la trehalasa, preferentemente caracterizado porque el inhibidor de la trehalasa es el gen en sentido opuesto al gen que codifica la información para la trehalasa o caracterizado porque el inhibidor de la trehalasa es la proteína 86kD de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*).  
35
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7, caracterizado porque una planta, o una parte de la misma, acumula trehalosa en cantidades superiores a 0,01% (peso fresco).  
40

Una planta, o una parte de dicha planta, o células de la planta, que se pueden obtener por un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la



- 8, la cual contiene trehalosa en cantidades superiores a 0,01% (peso en fresco), preferentemente caracterizado porque dicha planta, o una parte de la misma es de la especie *Solanaceae*, mas preferentemente *Solanum tuberosum* o *Nicotiana tabacum*.
- 5 10. Una parte de la planta según la reivindicación 9, la cual es un tubérculo o un micro-tubérculo.
11. Tubérculos o micro-tubérculos de *Solanum tuberosum* que contienen trehalosa.
12. El uso de una planta, o parte de la planta, según la reivindicación 9 para extraer trehalosa.
- 10 13. El uso de una planta, o parte de la planta, según la reivindicación 9 en un proceso de extracción forzosa de agua de dicha planta o parte de la planta.
14. Una planta según la reivindicación 9, la cual tiene una tolerancia a la tensión en aumento, preferentemente tolerancia a la sequía que crece.
- 15 15. Un gen expresible de la planta quimérica que incluye en la secuencia una región de iniciación de la transcripción que se obtiene de un gen, preferentemente expresado en una parte de la planta, particularmente el gen patatin de *Solanum tuberosum*, un índice de 5' sin traducir, un marco de lectura abierta codificando una actividad de sintasa de fosfato de trehalosa, y hacia abajo del
- 20 mencionado marco de lectura abierta una región del terminador transcripcional, preferentemente caracterizado porque dicha región del terminador transcripcional se puede obtener del gen inhibidor II de la proteinasa de *Solanum tuberosum*.
16. Un vector que incluye un gen expresible de la planta quimérica según la
- 25 reivindicación 15.
17. Un genoma de planta recombinante que incluye un gen quimérico según la reivindicación 16.
18. Una célula de planta que tiene un genoma recombinante según la reivindicación 17.
- 30 19. Una planta o una parte de la misma, que consiste esencialmente de células según la reivindicación 18, caracterizado porque dicha planta es *Solanum tuberosum*.
20. Una planta o una parte de la misma, según la reivindicación 19, la cual es un tubérculo o un micro-tubérculo.
- 35 21. Procedimiento para obtener trehalosa, incluyendo los pasos de crecimiento de las células de la planta según la reivindicación 18, o cultivando una planta según la reivindicación 19, o cultivando una parte de la planta según cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, extrayendo trehalosa de dichas células de la planta, de la planta o partes de la misma.
- 40 22. Procedimiento para obtener trehalosa, incluyendo los pasos de producción de trehalosa en las células de la planta, una planta o una parte de la misma, según un proceso de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, y preparar o extraer trehalosa de dichas células de la planta, de la planta o partes de la misma.



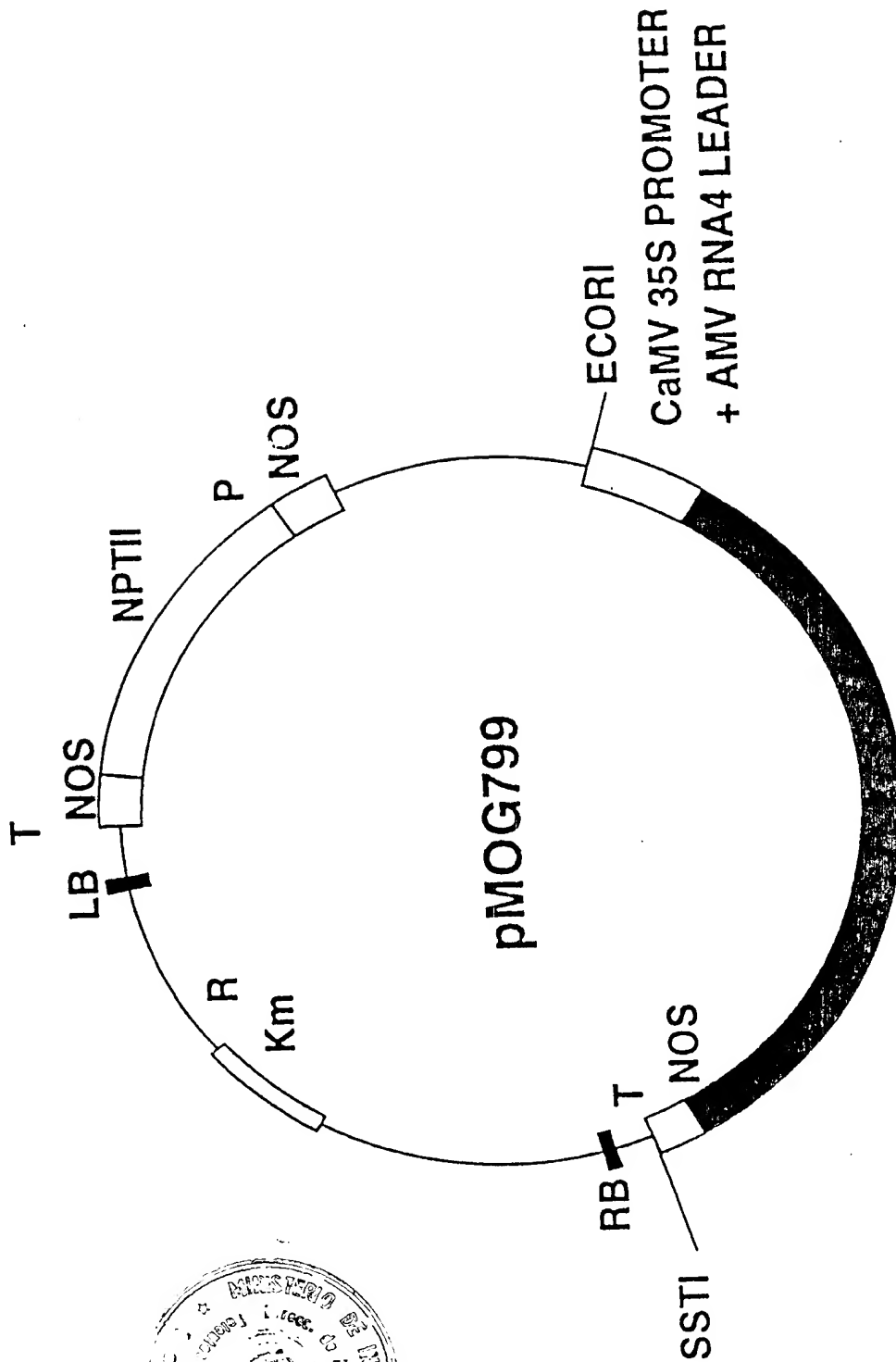
COMPENDIO

La invención proporciona un procedimiento para producir trehalosa en las células de las plantas capaces de producir trehalasa cultivando células de las plantas que tengan la información genética necesaria para la producción de trehalosa y trehalasa, o cultivando una planta o una parte de dicha planta que incluya dichas células de la planta, con la característica de que dichas células de la planta son cultivadas, o dicha planta o parte de la planta, es cultivada en la presencia de un inhibidor de la trehalasa.



- Figura 1.- Sintasa de fosfato 6 trehalosa Activador CaMV 35S + índice  
AMV ARN 4
- Figura 2.- Activador del patatin Gen TPS
- Figura 3.- Ingeniería de la producción de trehalosa en las plantas.
- 5 fotosintasa de la hoja  
sacarosa  
vacuola  
almidón  
plástido
- 10 Figura 4.- Levadura  
Conejo  
E. Coli  
Siikw.





TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE

Figure 1



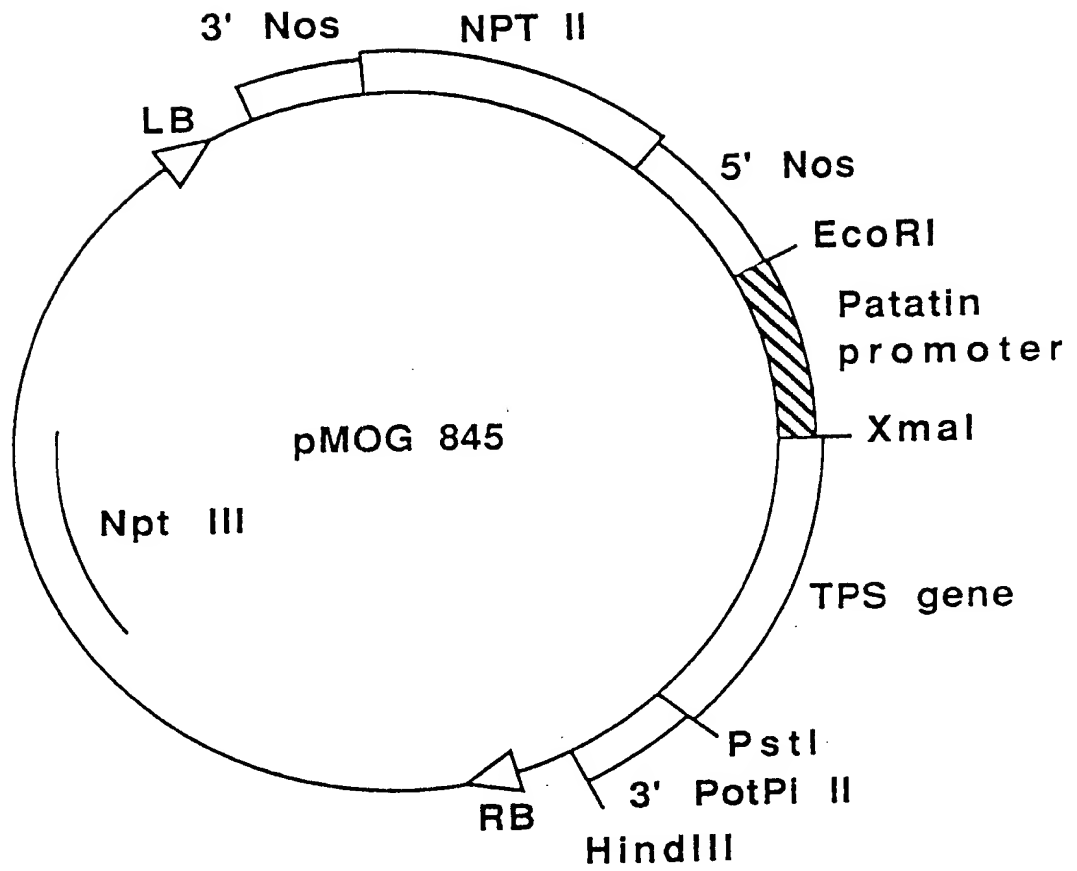


Figure 2



# ENGINEERING OF TREHALOSE-PRODUCTION IN PLANTS

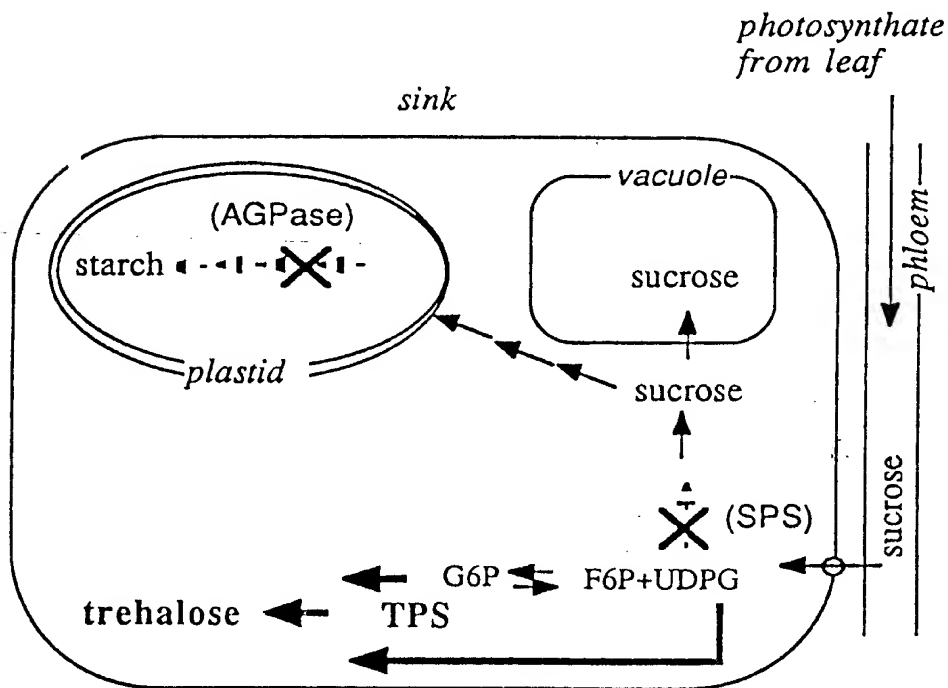


Figure 3

AA.	238	
Levadura	P Y A V P G G R F N E L Y G W D S Y M N A L L G L L E A N K T D V A R G M V	
Conejo	P F I V P G G R F V E F Y Y W D S Y W V M E G L L L S E M A E T V K G M L	
E. coli	P Y V V P G G R F R E V Y Y W D S Y F T M L G L A E S G H W D K V A D M V	
Siikw.	G F I V P G G R F K E I Y Y W D A Y W I I E G L L I T D M T E T A K G M I	
	Tase25----->	
	Tase24 ----->	
AA.		
Levadura	E H F I F E I N H Y G K I L N A N R S Y Y L C R S Q P P F L T E M	308
Conejo	Q N F L D L V T A Y G H I P N G G R V Y Y L Q R S Q P P L L T L M	
E. coli	A N F A H E I D T Y G H I P N G N R S Y Y L S R S Q P P F F A L M	
Siikw.	E N L I E L L Y K F G H I P N G S R W Y Y Q E R S Q P P L L A M	
	Tase26<-----	
AA.	644	
Levadura	A A T E G F G W V T N A R Y I L L G L K Y M N	664
Conejo	E V Q E G F G W T N G	
E. coli	P L Q D G F G W T N G	
Siikw.	V V Q S G F G W T N G	
	Tase27<-----	



Figure 4